

# **Étude des profils de méthylation et d'expression des lymphocytes T CD4+ dans l'asthme**

**Mémoire**

**Anne-Marie Boucher-Lafleur**

**Maîtrise en sciences cliniques et biomédicales de l'Université Laval offerte en  
extension à l'Université du Québec à Chicoutimi  
Maître ès sciences (M.Sc.)**

Québec, Canada

© Anne-Marie Boucher-Lafleur, 2019

# **Étude des profils de méthylation et d'expression des lymphocytes T CD4+ dans l'asthme**

**Mémoire**

**Anne-Marie Boucher-Lafleur**

Sous la direction de :

Catherine Laprise, directrice de recherche

## RÉSUMÉ

L'asthme est une maladie respiratoire chronique impliquant de l'inflammation, de l'hyperréactivité bronchique et un remodelage des voies respiratoires. Il s'agit d'un trait complexe résultant d'interactions entre des facteurs génétiques et environnementaux. La portion génétique de l'asthme a été bien décrite, avec une héritabilité estimée jusqu'à 60% selon les études. Une portion de l'héritabilité manquante dans l'asthme pourrait être expliquée par des facteurs épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN. Comme la méthylation est spécifique à chaque tissu, il est logique d'étudier des cellules ayant un rôle important dans l'asthme. C'est le cas des lymphocytes T CD4+ qui contribuent activement à la pathophysiologie de l'asthme.

L'objectif du présent projet était donc d'étudier les lymphocytes T CD4+ dans un contexte d'asthme, plus particulièrement leur patron de méthylation ainsi que leur patron d'expression. Ces lymphocytes ont été isolés du sang de plus de 200 individus faisant partie de la Cohorte familiale d'asthme du Saguenay–Lac-Saint-Jean. La méthylation et l'expression a ensuite été mesurée par séquençage. Après des contrôles de qualité, des données étaient disponibles pour 173 individus (107 asthmatiques, 66 témoins). Il a ainsi été possible d'identifier 2 146 sites CpG différemment méthylés chez les asthmatiques et 3 756 chez les asthmatiques allergiques ( $FDR \leq 0,05$ ,  $\Delta\text{-meth} \geq 5\%$ ). Pour l'expression, 57 et 33 gènes sont différemment exprimés chez les asthmatiques et les asthmatiques allergiques, respectivement ( $FDR \leq 0,05$ ). L'intégration des données génétique et d'expression ont permis d'identifier 2 253 eQTL significatifs ( $FDR \leq 0,049$ ). Ces résultats ont permis d'identifier l'implication de la voie de NF- $\kappa$ B ainsi que celle de l'IL-17 et -25 dans ces cellules, mais aussi l'implication de la famille de chemokine CXC et de EGF. En somme, cette étude a permis de caractériser plus précisément un type cellulaire dans l'asthme, toujours dans le but de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents impliqués dans cette condition.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	ii
TABLE DES MATIÈRES .....	iii
LISTE DES FIGURES .....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	vii
REMERCIEMENTS .....	xi
INTRODUCTION .....	1
1. Asthme .....	1
1.1 Épidémiologie .....	1
1.2 Phénotypes .....	2
1.3 Physiopathologie .....	3
1.3.1 Sensibilisation à un allergène .....	3
1.3.2 Phase précoce de l'inflammation .....	6
1.3.2.1 L'épithélium bronchique .....	6
1.3.2.2 Réexposition .....	6
1.3.3 Phase tardive de l'inflammation .....	8
1.3.3.1 Lymphocytes T CD4+ .....	8
1.3.3.2 Éosinophiles et neutrophiles .....	11
1.3.4 Le remodelage des voies respiratoires .....	12
2. Composante génétique .....	15
3. Composante environnementale .....	18
3.1 Épigénétique .....	18
3.1.1 Méthylation de l'ADN .....	20
3.3 Facteurs de risque .....	21
3.3.1 Âge et sexe .....	22
3.3.2 Obésité .....	23
3.3.3 Qualité de l'air .....	23
3.3.4 Tabagisme .....	25
4. Population à l'étude .....	25
4.1 Historique .....	25
4.2 La cohorte familiale d'asthme du Saguenay–Lac-Saint-Jean .....	27
5. Hypothèse et objectifs .....	29
CHAPITRE 1 – MÉTHODOLOGIE .....	30
1.1 Recrutement des participants .....	30
1.2 Isolation des lymphocytes T CD4+ .....	30
1.3 Données de méthylation .....	32
1.3.1 Séquençage (MCC-seq) .....	32
1.3.2 Alignement et contrôles qualités .....	34
1.4 Données d'expression .....	35
1.4.1 Séquençage de l'ARN .....	35
1.4.2 Alignement et contrôles qualités .....	37
1.5 Données génétiques .....	38
1.6 Analyses .....	38
1.6.1 Méthylation .....	38
1.6.2 Expression .....	40
1.6.3 Corrélations méthylation – expression .....	40
1.6.4 eQTL .....	41
CHAPITRE 2 – RÉSULTATS .....	42

2.1 Niveau différentiel de méthylation .....	43
2.1.1 Asthme.....	44
2.1.2 Asthme allergique .....	49
2.2 Niveau différentiel d'expression .....	51
2.2.1 Asthme.....	51
2.2.2 Asthme allergique .....	52
2.3 Corrélations méthylation- expression .....	54
2.4 eQTL .....	55
CHAPITRE 3– DISCUSSION .....	58
3.1 Différences de méthylation dans l'asthme.....	59
3.1.1 Implications de la famille de chemokine CXC dans l'asthme .....	60
3.2 Différences de méthylation dans l'asthme allergique .....	61
3.2.1 Implications de la voie de l'IL-17 et de l'IL-25 dans l'asthme allergique .....	62
3.3 Expression différentielle de gènes impliqués dans l'asthme et l'asthme allergique .....	63
3.4 Intégration des données.....	65
3.5 Le défi du séquençage de nouvelle génération.....	67
3.6 Limites de l'étude .....	68
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	70
1. Conclusion générale .....	70
2. Perspectives.....	70
BIBLIOGRAPHIE .....	72
Annexe I.....	81
Annexe II.....	86

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Réaction immunitaire d'hypersensibilité immédiate. ....	5
Figure 2. Réaction immunitaire au niveau des cellules épithéliales des voies respiratoires dans l'asthme. ....	7
Figure 3. Représentation des différents types de lymphocytes T différenciés impliqués dans l'asthme. ....	9
Figure 4. Processus de remodelage des voies respiratoires dans l'Asthme. ....	14
Figure 5. Les différentes catégories de mécanismes épigénétiques. ....	19
Figure 6. Facteurs de risque de l'asthme. ....	22
Figure 7. Schématisation du triple effet fondateur caractérisant la population du SLSJ. ....	26
Figure 8. Principe de la séparation négative des lymphocytes T CD4+ ....	32
Figure 9. Processus de création de la librairie pour le séquençage de l'ARN. ....	36
Figure 10. Distribution des sites CpG différemment méthylés ....	43

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Table phénotypique de la collection familiale d'asthme du SLSJ.....	28
Tableau 2. Caractéristiques phénotypiques des individus recrutés dans la présente étude.....	42
Tableau 3. Nombre de CpG différemment méthylés en présence d'asthme ou d'asthme allergique .....	43
Tableau 4. Meilleures différences de méthylation entre les individus asthmatiques et témoins .....	47
Tableau 5. Meilleures différences de méthylation pour les CpG situés dans des promoteurs entre les individus asthmatiques et les témoins .....	48
Tableau 6. Meilleures différences de méthylation entre les individus asthmatiques allergiques et les témoins .....	50
Tableau 7. Meilleures différences de méthylation pour les CpG situés dans des promoteurs entre les individus asthmatiques et les témoins .....	51
Tableau 8. Gènes différemment exprimés entre les individus asthmatiques et témoins .....	51
Tableau 9. Gènes différemment exprimés entre les individus asthmatiques allergiques et témoins.....	53
Tableau 10. Corrélations significatives entre la méthylation et le niveau d'expression.....	54
Tableau 11. eQTL significatifs pour les gènes différemment exprimés .....	55

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

## GÉNÉRALE

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ARNt	acide ribonucléique total
ATS	American Thoracic Society
BAL	<i>bronchoalveolar lavage</i>
C	cytosine
CD40	<i>cluster</i> de différenciation 40
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
DC	cellule dendritique
DMR	région différentiellement méthylée
DNMT	ADN méthyltransférase
EGF	facteur de croissance épidermique
FcεRI	récepteur de haute affinité de l'IgE
GM-CSF	facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
CpG	site cytosine-phosphate-guanine
GWAS	étude d'association pangénomique (genome-wide association study)
GxE	interaction gènes-environnement
HLA	antigènes des leucocytes humains
HMW	composés de poids moléculaire élevés de l'anglais <i>high molecular weight</i>
IFN $\gamma$	interféron gamma
Ig	immunoglobuline
IgE	immunoglobuline de type E
IL	interleukine
IL-1	interleukine 1
IL-3	interleukine 3
IL-4	interleukine 4
IL-5	interleukine 5
IL-6	interleukine 6
IL-8	interleukine 8
IL-9	interleukine 9
IL-10	interleukine 10
IL-13	interleukine 13
IL-17	interleukine 17
IL-21	interleukine 21
IL-22	interleukine 22
IL-25	interleukine 25
IL-33	interleukine 33
iLC2	cellule lymphoïde innée de type 2
IMC	indice de masse corporelle



LMW	composés de poids moléculaire faibles (de l'anglais <i>low molecular weight</i> )
mcc-seq	methyl-capture sequencing
miARN	micro-ARN
NF- $\kappa$ B	facteur nucléaire $\kappa$ B
PAMP	motifs moléculaires associés aux pathogènes
PBMC	cellules mononuclées du sang périphérique
PCR	réaction en chaîne par polymérase
PRR	récepteurs de reconnaissances de motifs cellulaires
SLSJ	Saguenay–Lac-Saint-Jean
SNP	polymorphisme d'un seul nucléotide
T <sub>H</sub>	lymphocyte T auxiliaire
T <sub>H</sub> 0	lymphocyte T auxiliaire naïf
T <sub>reg</sub>	lymphocyte T régulateur
TGF- $\beta$	facteur de croissance transformant bêta
TLR	récepteur <i>Toll-like</i>
TNF- $\alpha$	facteur de nécrose tumorale alpha
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
TSS	site d'initiation de la transcription
VEMS <sub>1</sub> /CVF	ratio volume expiratoire maximal en 1 seconde et capacité vitale forcée
WGS	<i>whole-genome sequencing</i>

## SYMBOLES DE GÈNES

ABCC3	<i>ATP binding cassette subfamily C member 3</i>
ABCC8	<i>ATP binding cassette subfamily C member 8</i>
ADAM33	<i>ADAM metalloproteinase domain 33</i>
AGPAT1	<i>1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1</i>
ANKRD20A11P	<i>ankyrin repeat domain 20 family member A11, pseudogene</i>
APOBEC3B	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3B</i>
ARMC3	<i>armadillo repeat containing 3</i>
ATF6B	<i>activating transcription factor 6 beta</i>
AVPR1A	<i>arginine vasopressin receptor 1A</i>
C15orf54	<i>chromosome 15 open reading frame 54 (putative)</i>
CACNA2D3	<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 3</i>
CADM1	<i>cell adhesion molecule 1</i>
CARD19	<i>caspase recruitment domain family member 19</i>
CDC20	<i>cell division cycle 20</i>
CDC6	<i>cell division cycle 6</i>
CDH1	<i>cadherin 1</i>
CKB	<i>creatine kinase B</i>
CLEC10A	<i>C-type lectin domain containing 10A</i>
CLEC1B	<i>C-type lectin domain family 1 member B</i>
CMTM5	<i>CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 5</i>
CNTNAP2	<i>contactin associated protein like 2</i>
CRYBB2P1	<i>crystallin beta B2 pseudogene 1</i>
CRYGN	<i>crystallin gamma N</i>

CSNK2B	casein kinase 2 beta
CXCL5	C-X-C motif chemokine ligand 5
EGF	epidermal growth factor
EPHA7	EPH receptor A7
FAM160B1	family with sequence similarity 160 member B1
FBXL19-AS1	FBXL19 antisense RNA 1
FES	FES proto-oncogene, tyrosine kinase
FZD7	frizzled class receptor 7
GATA2	GATA binding protein 2
GN	gametogenetin
GNG11	G protein subunit gamma 11
GP1BA	glycoprotein Ib platelet subunit alpha
GP9	glycoprotein IX platelet
GPBAR1	G protein-coupled bile acid receptor 1
GPRA	neuropeptide S receptor 1
GRB14	growth factor receptor bound protein 14
GSDMA	gasdermin A
GSDMB	gasdermin B
GSTM1	glutathione S-transferase mu 1
GUSBP1	GUSB pseudogene 1
HIST1H3C	H3 clustered histone 3
HIST1H3F	H3 clustered histone 7
HIST1H3G	H3 clustered histone 8
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
HLX	H2.0 like homeobox
HSPA2	heat shock protein family A (Hsp70) member 2
IKZF3	IKAROS family zinc finger 3
IL17RB	interleukin 17 receptor B
IL1RL1	interleukin 1 receptor like 1
IL1RL2	interleukine 1 receptor like 2
KCNA5	potassium voltage-gated channel subfamily A member 5
KIF13A	kinesin family member 13A
KIRREL3	kirre like nephrin family adhesion molecule 3
LATS2	large tumor suppressor kinase 2
LINC00950	long intergenic non-protein coding RNA 950
LINC01694	long intergenic non-protein coding RNA 1694
LIPH	lipase H
LOC100287036	uncharacterized LOC100287036
LOC339166	uncharacterized LOC339166
LOC391322	uncharacterized LOC391322
LOH12CR2	loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 2
MARC1	mitochondrial amidoxime reducing component 1
MKI67	marker of proliferation Ki-67
MORC1	MORC family CW-type zinc finger 1
MS4A4A	membrane spanning 4-domains A4A
MYL9	myosin light chain 9
NAT8B	N-acetyltransferase 8B

NT5DC2	5'-nucleotidase domain containing 2
OBSCN	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF
ORMDL3	ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3
P2RY12	purinergic receptor P2Y12
PARN	poly(A)-specific ribonuclease
PDGFB	platelet derived growth factor subunit B
PDGFRA	platelet derived growth factor receptor alpha
PHTF1	putative homeodomain transcription factor 1
PLXND1	plexin D1
PPBP	pro-platelet basic protein
PPP1R26	protein phosphatase 1 regulatory subunit 26
PRDM8	PR/SET domain 8
PRH1-PRR4	PRH1-PRR4 readthrough
PTCRA	pre T cell antigen receptor alpha
QPR1	quinolinate phosphoribosyltransferase
RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4
RGS7	regulator of G protein signaling 7
RPS6KA2	ribosomal protein S6 kinase A2
RRN3P1	RRN3 homolog, RNA polymerase I transcription factor pseudogene 1
SCN3A	sodium voltage-gated channel alpha subunit 3
SEC14L5	SEC14 like lipid binding 5
SEMA3G	semaphorin 3G
SH3TC2	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2
SLC2A5	solute carrier family 2 member 5
SLFN14	schlafen family member 14
SNORD116-21	small nucleolar RNA, C/D box 116-21
SPOCD1	SPOC domain containing 1
SRMS	src-related kinase lacking C-terminal regulatory tyrosine and N-terminal myristylation sites
STEAP4	STEAP4 metalloredutase
SUN5	Sad1 and UNC84 domain containing 5
TBL2	transducin beta like 2
TMEM40	transmembrane protein 40
TMEM64	transmembrane protein 64
TNXB	tenascin XB
TREML1	triggering receptor expressed on myeloid cells like 1
TUBB	tubulin beta class I
TUBB1	tubulin beta 1 class VI
UBAC2-AS1	UBAC2 antisense RNA 1
VAR2	valyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial
VEGFC	vascular endothelial growth factor C
VEPH1	ventricular zone expressed PH domain containing 1
VTRNA1-3	vault RNA 1-3
ZFPM2	zinc finger protein, FOG family member 2
ZPBP2	zona pellucida binding protein 2

# REMERCIEMENTS

Je voudrais commencer par remercier ma superviseure, Catherine Laprise, de m'avoir confié un projet d'envergure qui a demandé beaucoup de travail, mais qui m'a tellement appris. Merci de ta patience, de ta confiance. Tu es un mentor exemplaire, honnête et intègre, qui a réussi à me faire croire en mes propres capacités.

Merci tout particulier à Lucile Pain, ma complice de laboratoire pendant 2 ans. Elle a été d'une aide précieuse, autant en laboratoire que pour mon niveau de motivation! À toute l'équipe du laboratoire, merci de m'avoir écouté et d'avoir été là quand j'avais beaucoup trop d'interrogations, particulièrement la professionnelle de recherche Anne-Marie Madore. J'ai découvert des collègues extraordinaires, mais aussi des amis en or qui m'apportent autant au niveau professionnel que personnel.

Un grand merci également à la clinique Écogène-21 qui nous a ouvert ses portes pour le recrutement des patients durant un an et demi. Merci aux infirmières de recherche présentes et à Marie-Claude Morissette, une coordonnatrice qui a grandement facilité notre travail.

Je voudrais remercier mes amis de m'avoir encouragé et soutenu dans les moments les plus difficiles. Les filles, sans vous je ne serais pas ici aujourd'hui. Plus particulièrement, merci à toi Mathieu de toujours m'écouter et de me remonter le moral quand je vois tout comme une montagne insurmontable.

Finalement, je terminerai en remerciant mes parents qui m'ont donné les outils nécessaires pour me dépasser. Vous êtes un exemple de persévérance et de travail acharné et je ne pouvais passer sous silence le soutien que vous m'avez toujours offert.

# INTRODUCTION

## 1. Asthme

### 1.1 Épidémiologie

L'asthme est une maladie respiratoire chronique dont les principaux symptômes sont des sifflements respiratoires, des épisodes de toux ainsi qu'une oppression à la poitrine, le tout causé par de l'inflammation et un remodelage des voies respiratoires [1]. On estime que plus de 235 millions d'individus en sont atteints mondialement [2]. La prévalence de l'asthme n'a cessé d'augmenter depuis les dernières décennies. Cette augmentation est plus particulièrement observée chez les enfants pour qui cette maladie chronique est la plus courante [2]. Au Canada, les données les plus récentes indiquent que 8,1% de la population, soit près de 2,4 millions d'individus âgés de 12 ans et plus, présentent cette condition [3]. Par contre, la mortalité associée à cette maladie est en constante diminution depuis les dernières années et représente moins de 1 décès pour 100 000 personnes au Québec [4]. Ce qui préoccupe davantage est le fait que l'asthme représente la première cause d'admission des Canadiens aux urgences [5]. Comme le nombre d'individus atteints ne cesse d'augmenter et que cette condition est souvent sous-diagnostiquée, les coûts y étant reliés sont considérables pour le système public de santé canadien et sont évalués à 5,8 milliards de dollars annuellement [5, 6]. Il s'agit aussi de la cause principale expliquant l'absentéisme scolaire chez les enfants canadiens puisque le taux d'asthme chez les enfants et les adolescents est plus élevé que dans la population adulte [7]. Il est également connu que l'asthme est une maladie qui apparaît plus tôt chez les garçons lors de l'enfance et que cette tendance s'inverse lors de l'adolescence puisque ceux-ci sont plus prompts à une rémission [8]. Les femmes ont donc tendance à développer de l'asthme plus tard à l'enfance et sont également plus propices à le développer à l'adolescence ou au début de la période adulte [1].

Il est également important de savoir que les symptômes de l'asthme sont variables dans le temps et en intensité. De ce fait, il est probable qu'un individu asthmatique expérimente des périodes d'exacerbations où les symptômes et les manifestations cliniques s'aggravent, correspondant à un risque plus élevé d'hospitalisation et de mortalité [9]. Il est tout aussi probable que l'inverse se produise; un asthmatique peut donc vivre une rémission spontanée où il ne présente aucun symptôme [10, 11].

À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement qui guérit l'asthme. L'approche thérapeutique en vigueur permet plutôt de contrôler les symptômes et d'atténuer leur effet sur la santé respiratoire [11]. Parmi ces traitements, les plus communément utilisés sont les bronchodilatateurs et les corticostéroïdes inhalés permettant de soulager les symptômes en augmentant le diamètre des voies respiratoires à court ou à long terme et en diminuant l'inflammation respectivement [12]. Toutefois, certains asthmatiques seront peu réceptifs aux traitements en vigueur, particulièrement les individus asthmatiques sévères, ce qui ne permet pas de soulager leurs symptômes et d'améliorer leurs conditions de vie [13]. Dans ce contexte, il est donc nécessaire d'étudier cette maladie respiratoire afin de mieux la comprendre et d'en expliquer les mécanismes sous-jacents. Ceci pourra ultimement permettre de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques potentiellement utilisables dans le traitement et la prévention de l'asthme.

## **1.2 Phénotypes**

L'asthme est une maladie dont les manifestations sont très variables d'un individu à un autre, ce que l'on désigne comme l'hétérogénéité clinique. Cette hétérogénéité rend plutôt difficile la classification des individus atteints en groupes distincts [4]. Toutefois, les progrès dans le domaine de la recherche en asthme permettent d'affiner cette classification et de redéfinir sans cesse, de façon toujours plus précise, les catégories d'asthmatiques [14]. Les deux catégories majeures utilisées pour classer les asthmatiques sont les phénotypes cliniques et les phénotypes cellulaires [4, 14]. Il est également possible d'utiliser le terme endotype pour désigner de multiples phénotypes associés à différentes voies pathophysiologiques.

D'une part, les phénotypes cliniques permettent de regrouper les individus atteints selon les manifestations cliniques de l'asthme comme les symptômes, mais surtout grâce aux résultats de tests respiratoires, comme la spirométrie (état de la fonction respiratoire), et d'allergies (test à la piqure), en plus de prendre en compte la réponse aux traitements [14]. Il est donc possible de catégoriser les phénotypes cliniques d'asthme selon l'élément déclencheur des symptômes, par exemple l'asthme à l'exercice (déclenché par une activité physique), l'asthme professionnel (induit par une composante dans l'environnement de travail) ou l'asthme intrinsèque [4, 14, 15]. Le concept d'asthme intrinsèque, ou asthme allergique existe depuis plusieurs décennies pour caractériser l'asthme [16]. En effet, près de 75% des individus asthmatiques sont également allergiques [7]. Il s'agit d'un type d'asthme

déclenché par une réponse excessive suite à une exposition à un allergène, une substance considérée à tort comme pathogène par le système immunitaire [17]. Cet allergène peut être de nature varié : animale (chats, chiens et acariens étant les plus communs), végétale (notamment les arbres et les herbacés), alimentaire, etc. [17]. Il est aussi possible de caractériser cliniquement l'asthme selon la sévérité de sa manifestation, allant de léger à sévère. Les paramètres permettant de le classer sont documentés dans les recommandations faites par la *Global Initiative for Asthma* [18]. Il sera question d'asthme allergique dans le présent mémoire étant donné qu'il s'agit du type le plus courant et qu'il caractérise la population à l'étude dans ce projet.

Pour ce qui est des phénotypes moléculaires, ceux-ci sont plutôt utilisés afin de caractériser le type d'asthme en fonction de la présence accrue de certaines cellules immunitaires au site d'infection, à savoir les bronches des individus asthmatiques [4, 14]. Par exemple, il peut être question d'asthme éosinophilique lorsque les éosinophiles sont prédominants au niveau des voies respiratoires ou encore d'asthme neutrophilique quand ce sont les neutrophiles qui sont prépondérants et indicateurs de l'asthme [19]. Toutefois, il est important de savoir que ces phénotypes cellulaires peuvent être associés avec les phénotypes cliniques afin de définir plus précisément l'endotype d'un individu atteint d'asthme [4].

### **1.3 Physiopathologie**

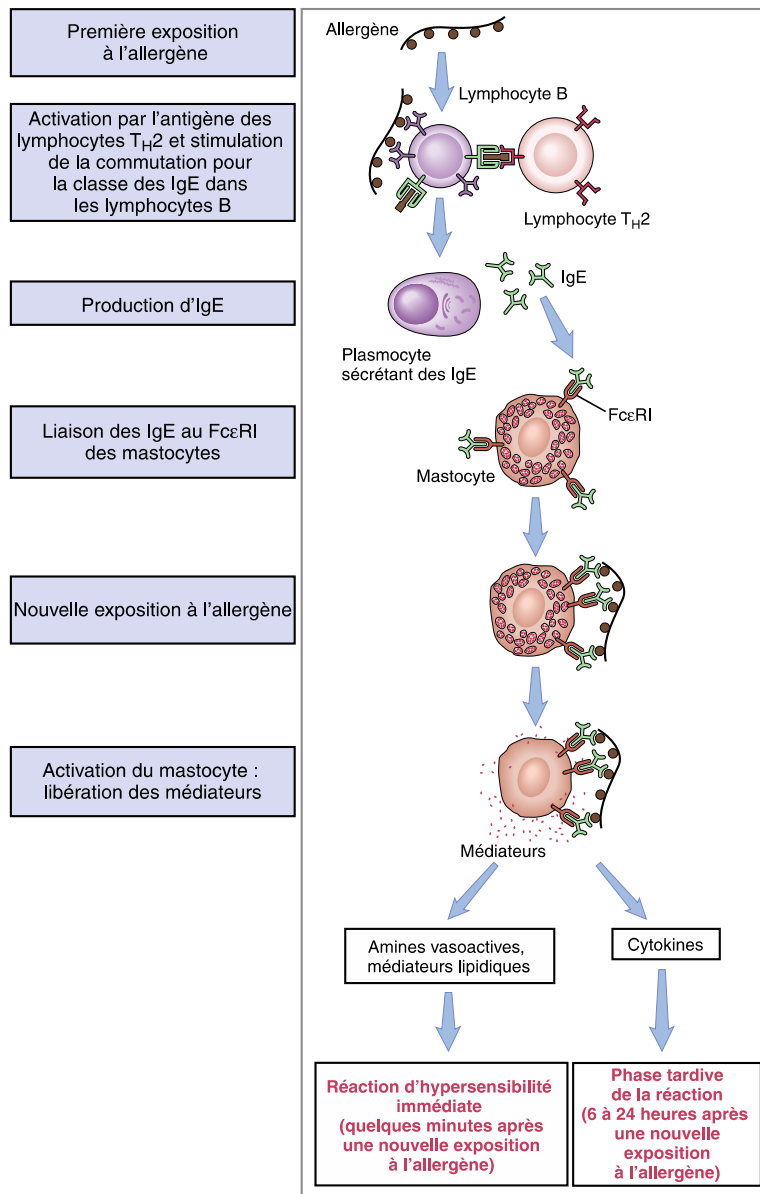
L'asthme est principalement caractérisé par une obstruction bronchique, une hyperréactivité bronchique ainsi que par une inflammation et un remodelage des voies respiratoires [4]. Ces mécanismes sont la conséquence directe de l'action du système immunitaire qui cherche à défendre l'organisme contre un stimulus. Ces stimuli peuvent être d'origine virale ou bactérienne, mais dans le cas présent, le stimulus d'intérêt sera un allergène puisque l'asthme, ainsi que l'allergie, est considéré comme une réaction d'hypersensibilité immédiate [17].

#### **1.3.1 Sensibilisation à un allergène**

Le processus physiopathologique commence par la phase de sensibilisation à l'allergène (Figure 1). Il s'agit du premier contact entre le système immunitaire et l'allergène. Celui-ci pénétrera la barrière épithéliale bronchique et sera capté par les cellules dendritiques (DC) qui l'internaliseront [20].

Ces cellules dégraderont l'allergène en peptides, puis les présenteront aux lymphocytes T auxiliaires CD4+ (T<sub>H</sub>) naïfs (T<sub>H0</sub>) grâce au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II [20]. S'en suivra par la suite l'activation et la différenciation des T<sub>H0</sub> en cellules effectrices, principalement vers le type T<sub>H2</sub> dans le cas de l'asthme allergique [21]. La différenciation de ces cellules permettra également l'activation de la production de cytokines, des médiateurs servant de voies de communication entre les cellules [22]. Un contact s'effectuera ensuite entre les lymphocytes T<sub>H2</sub> et les lymphocytes B grâce au récepteur de surface CD40 et à son ligand CD40L [17]. Ces lymphocytes B activés seront maintenant appelés plasmocytes puisqu'ils deviennent des cellules effectrices produisant des anticorps dirigés vers les antigènes spécifiques de l'allergène, les immunoglobulines (Ig) de type E (IgE) [17]. Les IgE sont des molécules caractéristiques de la réponse allergique. L'activation des lymphocytes B se fait également grâce aux cytokines sécrétées par les lymphocytes T<sub>H2</sub> [23]. Par la suite, les IgE seront captées et reconnues par les mastocytes grâce aux récepteurs FcεRI ayant une affinité élevée pour ce type d'anticorps [17]. Le système immunitaire sera alors équipé pour reconnaître rapidement et efficacement cet allergène lors d'une réexposition puisque les mastocytes seront recouverts par les anticorps IgE spécifiques à l'allergène [24]. De ce fait, lors d'une réexposition, les mastocytes seront activés lorsque l'allergène se liera à au moins deux anticorps IgE à leurs surfaces [24]. Rapidement, ces cellules pourront amorcer la phase précoce de l'inflammation et également contribuer à la phase tardive de celle-ci.





**Figure 1. Réaction immunitaire d'hypersensibilité immédiate.**

L'allergène engendrera ultimement la production d'IgE une fois que la stimulation des lymphocytes B aura eu lieu par les lymphocytes  $T_H2$ . Ces IgE seront reconnues par les mastocytes qui prendront le relais de la réaction d'hypersensibilité. Ces cellules seront donc en mesure de reconnaître efficacement l'allergène en cas de réexposition puisque ceux-ci expriment maintenant des anticorps spécifiques à cet allergène exprimés au niveau de leurs récepteurs spécifiques ( $Fc\epsilon RI$ ). Ceci permettra à l'organisme d'orchestrer les deux paliers de réactions immunitaires, soit la phase précoce (hypersensibilité immédiate) quelques minutes après une exposition à l'allergène et la phase tardive qui survient entre 5 et 24 heures après le contact et orchestrée par les cytokines qui agiront sur d'autres types cellulaires importants (tirée de Abbas et al. 2016).

### **1.3.2 Phase précoce de l'inflammation**

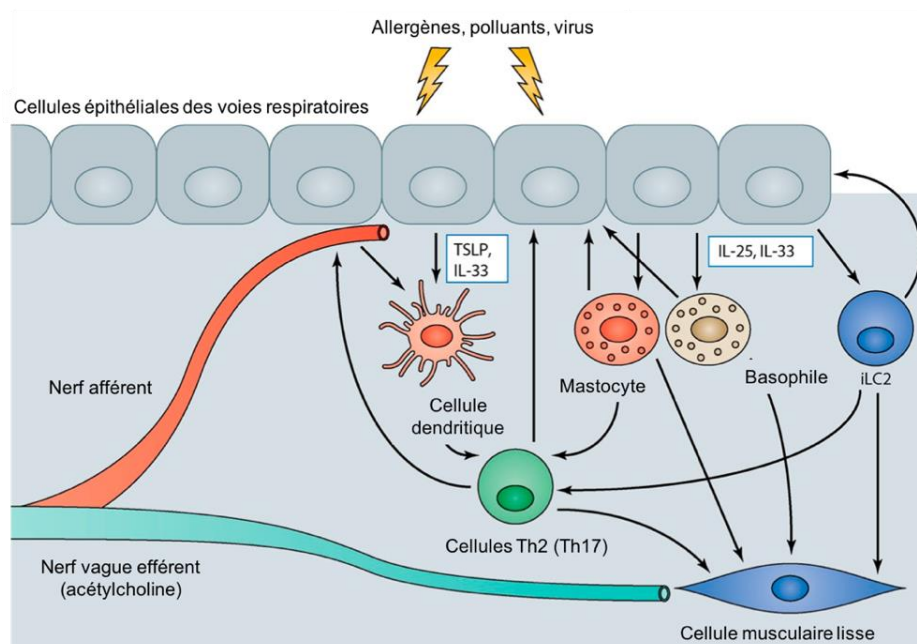
#### **1.3.2.1 L'épithélium bronchique**

Dans un contexte d'asthme, la phase dite précoce de l'inflammation se produit presque immédiatement suite au contact avec un stimulus inhalé au niveau de l'épithélium bronchique qui tapisse l'intérieur des voies respiratoires. Il s'agit de la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes de l'air ambiant [25]. L'épithélium bronchique est composé de cellules ciliées et de cellules sécrétrices qui permettent le processus de clairance mucociliaire qui consiste à l'emprisonnement des pathogènes et contaminants dans le mucus et de son transport hors des voies respiratoires [25, 26]. Cet épithélium est également un acteur important de l'immunité innée et est impliqué dans le processus inflammatoire enclenché par un allergène [27]. En effet, les cellules épithéliales peuvent reconnaître les allergènes grâce à des récepteurs de reconnaissances de motifs cellulaires (PRR) qui se lieront à des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) exprimés sur leur surface [28]. Une réaction immunitaire peut aussi être enclenchée suite à un dommage aux jonctions des cellules épithéliales, ce qui compromet l'intégrité de cette barrière [28]. Une fois en état d'alerte, les cellules épithéliales relâcheront des médiateurs de l'inflammation pour relayer le signal aux autres cellules immunitaires qu'une réaction inflammatoire se met en branle [29]. En effet, comme illustré à la Figure 2, les cellules libéreront certaines cytokines pro-inflammatoires dont l'interleukine (IL) 25, l'IL-33 et le *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) [29].

#### **1.3.2.2 Réexposition**

Une réexposition avec un allergène déjà connu du système immunitaire engendrera une réaction rapide de la part des mastocytes. En effet, la voie de signalisation enclenchée au contact de l'antigène spécifique à l'allergène avec le complexe IgE- récepteur FcεRI mènera à une libération de médiateurs de l'inflammation soit l'histamine, les leucotriènes et la prostaglandine par dégranulation des mastocytes [30]. L'histamine sera reconnue par plusieurs cellules immunitaires différentes et agira également rapidement sur les cellules musculaires lisses alors que les leucotriènes sont des médiateurs lipidiques de l'inflammation qui agiront principalement sur les mastocytes, les éosinophiles, les macrophages et les lymphocytes B [31, 32]. Finalement, la prostaglandine, libérée en grande quantité, mènera au recrutement de cellules immunitaires en plus d'activer les lymphocytes T et les éosinophiles [33]. Ces trois médiateurs contribuent donc à l'inflammation chronique observée dans l'asthme, à la bronchoconstriction des voies respiratoires ainsi qu'aux différents processus modifiant

leur structure, un phénomène appelé remodelage des voies respiratoires et qui entraîne divers symptômes respiratoires [30].



**Figure 2. Réaction immunitaire au niveau des cellules épithéliales des voies respiratoires dans l'asthme.**

Lors d'un contact avec un allergène ou une substance irritante, les cellules épithéliales relâcheront l'IL-25, IL-33 et le TSLP. Ceci permettra dans un premier temps de relayer le signal et de recruter d'autres types de cellules immunitaires : cellules dendritiques (par IL-33 et TSLP), mastocytes, basophiles et cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) (par IL-25 et IL-33). Ultimement, l'activation de ces cellules permettra le recrutement des lymphocytes T, en plus d'agir sur les cellules musculaires lisses par des agents bronchoconstricteurs. Également, ces cytokines pro-inflammatoires agiront sur les nerfs des voies respiratoires qui libéreront de l'acétylcholine, une protéine causant une bronchoconstriction des cellules musculaires lisses des voies respiratoires (traduit de [29]).

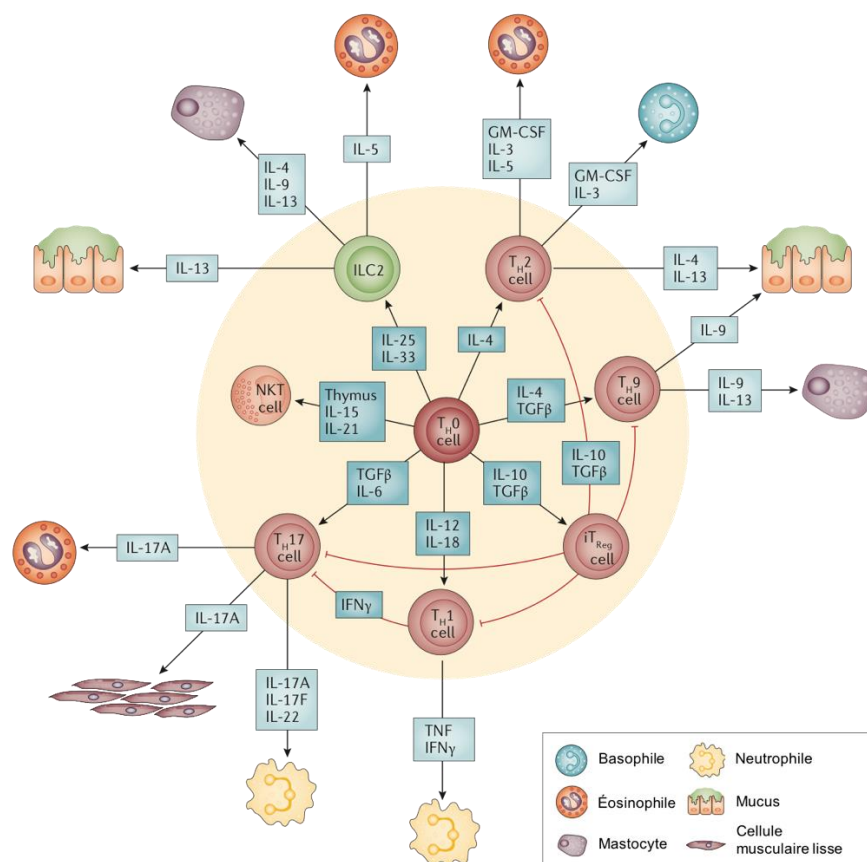
Un autre acteur important de la phase précoce de l'inflammation dans l'asthme est le basophile, un type cellulaire appartenant à la famille des granulocytes, qui comprend aussi les éosinophiles et les neutrophiles. Ce type cellulaire pourra également être activé au contact de l'allergène puisqu'il exprime aussi le complexe IgE-récepteur FcεRI [34]. Ces cellules libéreront également de l'histamine en plus de l'IL-4 [34]. Cette cytokine pro-inflammatoire agira sur les lymphocytes T<sub>H0</sub> en stimulant la différenciation de ces cellules vers différents sous-types [1]. Les lymphocytes T interviendront plutôt lors de la phase tardive de l'inflammation.

### 1.3.3 Phase tardive de l'inflammation

Cette phase du processus inflammatoire arrive à retardement, c'est-à-dire de 2 à 24 heures après un nouveau contact avec l'allergène [4]. Cette réaction implique plus particulièrement les lymphocytes T CD4+ différenciés qui constituent à eux seuls des acteurs clés de la physiopathologie de l'asthme [35]. En effet, on en connaît actuellement plusieurs types caractérisés par des patrons de sécrétions de cytokines pro-inflammatoires différentes [36]. Ceux-ci auront une influence spécifique sur les autres cellules immunitaires ainsi que sur les cellules composant les voies respiratoires. C'est d'ailleurs pour leurs rôles centraux et spécifiques qu'ils ont été ciblés dans la présente étude. Les éosinophiles et les neutrophiles seront aussi abordés dans la présente section.

#### 1.3.3.1 Lymphocytes T CD4+

Les cellules  $T_H0$  ne possèdent pas de fonction particulière et ne produisent aucune cytokine propageant l'inflammation [36]. Ceux-ci doivent donc être activés vers une voie ou une autre afin qu'ils acquièrent la capacité de sécréter différents médiateurs orchestrant la réponse tardive dans l'asthme (Figure 3). Pendant longtemps, on a cru que seulement deux types de CD4+ étaient impliqués dans la pathophysiologie de l'asthme soit  $T_H1$  et  $T_H2$  dans ce que l'on appelle la balance  $T_H1/T_H2$  [37]. Selon ce paradigme, les deux voies de différenciation sont exprimées de manière équivalente dans l'organisme d'un individu sain [37, 38]. Un débalancement en faveur du type  $T_H1$  entraînerait des maladies de types auto-immunes alors que l'inverse pourrait amener des maladies de type allergiques [38]. Dans le cas de l'asthme allergique, le type  $T_H2$  est dominant et est encore considéré comme le type principal de lymphocytes impliqués dans la pathophysiologie. Pourtant, il s'est avéré que la situation semble plus complexe étant donné que d'autres sous-types de CD4+ ont été mis en évidence dans l'asthme dont les  $T_H17$ , les cellules T régulatrices ( $T_{reg}$ ) et plus récemment encore les  $T_H9$  [1, 39].



**Figure 3. Représentation des différents types de lymphocytes T différenciés impliqués dans l'asthme.**

Les lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup> dit naïfs (T<sub>H0</sub>) se différencieront en différents types activés selon les médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire. Ceux-ci libéreront par la suite différents médiateurs (cytokines) pro-inflammatoires qui auront un effet sur différents types cellulaires, autant immunitaires (neutrophiles, basophiles, éosinophiles, mastocytes) que constituants des voies respiratoires (cellules épithéliales sécrétrices de mucus, cellules musculaires lisses). Ceci aura pour effet de continuer la réponse immunitaire enclenchée et d'entraîner les manifestations de l'asthme (traduit de Holgate *et al.* 2015).

Les lymphocytes T<sub>H2</sub> sont les principaux sous-types de CD4<sup>+</sup> impliqué dans une réaction asthmatique allergique. Les T<sub>H2</sub> sont activés grâce à l'IL-4 sécrétée entre autres par les basophiles recrutés plus tôt dans le processus inflammatoire [35]. Une fois activées, les cellules T<sub>H2</sub> sécrèteront de l'IL-4 à leur tour, mais aussi de l'IL-3, l'IL-5, l'IL-13 ainsi que le facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages (GM-CSF) [20]. Le niveau de certaines de ces cytokines a déjà été démontré comme étant plus élevé chez les individus asthmatiques avant et après une stimulation allergique [40]. L'IL-4 est un acteur important dans l'asthme puisque cette cytokine continuera de stimuler la différenciation de lymphocytes vers le type T<sub>H2</sub> en plus d'avoir un impact sur la production d'IgE par les lymphocytes B, entretenant donc l'inflammation [41, 42]. Les autres cytokines produites par les cellules T<sub>H2</sub> permettront le recrutement d'autres cellules immunitaires, particulièrement les

éosinophiles grâce à l'IL-5 qui constituent un type cellulaire étroitement associé aux cellules T<sub>H</sub>2 et caractéristiques de l'asthme allergique [16]. Finalement, les cytokines sécrétées par les T<sub>H</sub>2 agiront également sur certaines cellules constituant les voies respiratoires, à savoir les cellules épithéliales sécrétrices de mucus et les cellules musculaires lisses. Cette action contribuera directement aux mécanismes de remodelage des voies respiratoires et mènera aux symptômes de l'asthme que l'on connaît [20, 42]. Il est en effet connu que l'hyperréactivité bronchique est corrélée avec une plus grande quantité de cytokines de type T<sub>H</sub>2 et que l'activité de ce type de cellule est plus élevée chez les personnes asthmatiques allergiques [35, 43].

Les cellules de type T<sub>H</sub>17 ont elles aussi été associées à l'asthme puisqu'une augmentation de ces cellules dans la circulation sanguine a été observée chez les individus asthmatiques [44]. Elles contribueront au processus inflammatoire par la libération d'IL-17, d'IL-21 et d'IL-22 [20, 45]. Ces cytokines pro-inflammatoires auraient une influence sur le recrutement des éosinophiles, enclenché par les cellules T<sub>H</sub>2, en le stimulant, en plus de provoquer la prolifération et la contraction des cellules musculaires lisses bronchiques [46]. Plus spécifiquement, la libération d'IL-17 stimulerait le recrutement des neutrophiles sur le site de l'inflammation, à savoir le tissu bronchique [47]. Une plus grande quantité d'IL-17 a également été observée chez les individus asthmatiques comparativement à des individus témoins, accentuant davantage l'implication de ce type cellulaire dans l'asthme [44].

Les cellules T<sub>H</sub>9 ont été mises en évidence récemment puisqu'à l'origine on croyait que ces cellules faisaient partie du type T<sub>H</sub>2 [48]. Celles-ci sont caractérisées par la sécrétion d'IL-9 principalement [20, 35]. Il a en effet été démontré que cette cytokine était présente en quantité plus élevée dans des lavages broncho-alvéolaires (BAL) d'individus asthmatiques en réponse à une stimulation allergique [49]. Dans un contexte d'asthme, l'IL-9 aura comme principal effet de stimuler la prolifération et l'activation des mastocytes [50]. Son impact se fera également ressentir au niveau du processus de remodelage des voies respiratoires, plus particulièrement sur la production de mucus dans l'épithélium bronchique [35, 50]. L'IL-9 aurait également un impact sur l'action des lymphocytes B et T, en maintenant vraisemblablement l'inflammation au niveau des voies respiratoires [48, 51, 52].

Le dernier type de CD4+ important à mentionner est celui des cellules T<sub>reg</sub>. Celles-ci sont principalement impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire puisque leur action ira à l'encontre des autres types de cellules CD4+ en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-10 et le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [53]. L'action de ces cellules est donc de diminuer l'inflammation comme démontré dans une étude de Lewkowich et collègues où l'inflammation ainsi que l'hyperréactivité bronchique étaient accrues lors d'une stimulation allergique dans un contexte de déplétion en cellules T<sub>reg</sub> dans des modèles murins [54]. Les cellules T<sub>reg</sub> ont donc un rôle protecteur en modulant la réponse immunitaire en cours chez les individus asthmatiques [45]. La stimulation de la différenciation des cellules T<sub>H0</sub> vers la voie T<sub>reg</sub> représente donc une avenue thérapeutique pertinente dans le traitement de l'inflammation dans l'asthme [55].

### 1.3.3.2 Éosinophiles et neutrophiles

Les neutrophiles et les éosinophiles, deux membres de la famille des granulocytes, sont aussi des acteurs impliqués dans la phase tardive de l'inflammation dans l'asthme. La présence d'éosinophiles dans les tissus des voies respiratoires est une caractéristique importante de l'asthme puisque leur abondance peut aussi être corrélée avec la sévérité de la maladie [56]. Une étude longitudinale de patients asthmatiques sévères a en effet démontré que la quantité d'éosinophiles dans les expectorations était un marqueur efficace de l'asthme sévère n'étant pas contrôlé par la médication [57]. Ceux-ci sont en effet principalement recrutés dans les poumons par les cellules T<sub>H2</sub> grâce à l'IL-5, mais également par l'IL-3, GM-CSF et les éotaxines [30]. Les granules à l'intérieur du cytoplasme des éosinophiles contiennent des protéines basiques majeures, des peroxydases, des protéines cationiques et des neurotoxines dérivées des éosinophiles [56, 58, 59]. Les éosinophiles ont aussi la capacité de synthétiser et de libérer différentes cytokines dont une grande variété d'interleukines (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 notamment), l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) ainsi que TGF- $\beta$  [30, 60]. Il s'agit d'une cellule effectrice importante puisque sa présence dans le tissu bronchique aura un impact sur le remodelage des voies respiratoires [61]. En effet, ces cellules aggraveront l'inflammation locale, perpétuant ainsi la réponse de l'organisme notamment grâce à la libération des leucotriènes [60]. Les produits relâchés par les éosinophiles entraîneront aussi des dommages aux tissus bronchiques puisque le contenu des granules des éosinophiles a été démontré comme toxique pour les cellules humaines [60]. À titre d'exemple, les peroxydases et les neurotoxines ont été démontrées comme étant impliquées dans les dommages épithéliaux dans l'asthme allergique [62]. TGF- $\beta$  est également une

substance relâchée par les éosinophiles qui aura un impact sur le remodelage des voies respiratoires en stimulant l'hyperplasie du muscle lisse et le processus de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes notamment [63, 64].

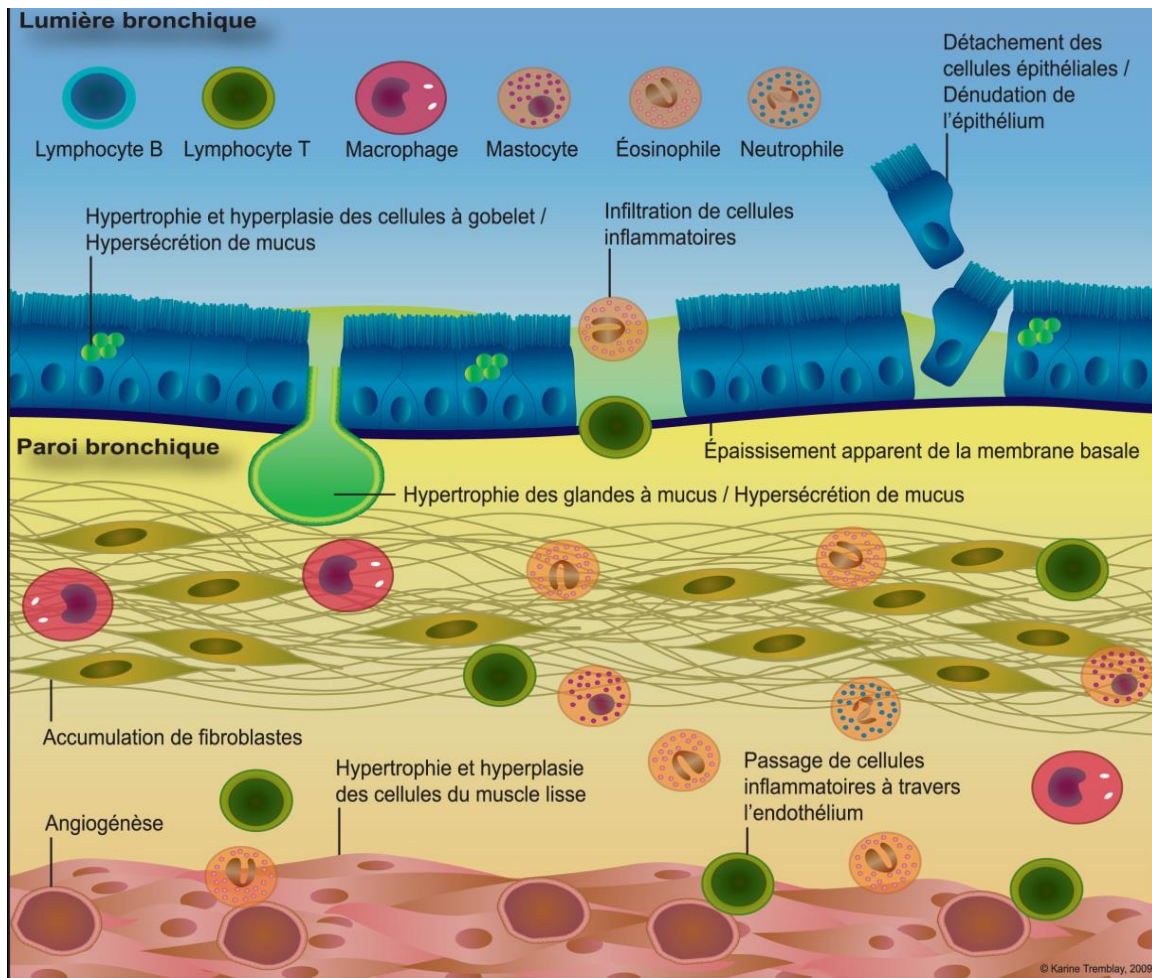
Pour ce qui est des neutrophiles, ceux-ci sont recrutés sur le lieu de la réponse à l'allergène grâce aux IL-8 et IL-17, libérées par les cellules  $T_H1$  et  $T_H17$  [65]. Ces cellules, au même titre que les éosinophiles, auraient un impact et une fonction importante dans l'asthme allergique puisqu'une quantité élevée de ce type cellulaire a été mise en évidence dans des BAL d'asthmatiques sévères [20, 66]. Les neutrophiles libéreront de l'IL-8 qui continuera le processus d'inflammation puisque cette cytokine recrutera d'autres neutrophiles, créant une boucle de rétroaction [67]. Il est également envisagé que les neutrophiles puissent libérer de l'IL-33 et le TSLP, des médiateurs qui contribuerait à l'inflammation en plus de contribuer à la sensibilisation aux allergènes [25, 68]. Il est également connu que ces cellules ont un impact sur le remodelage des voies respiratoires puisqu'elles peuvent aussi libérer des métalloprotéases et des élastases, des molécules impliquées dans l'hypersécrétion de mucus et la bronchoconstriction des voies respiratoires [30, 67].

#### **1.3.4 Le remodelage des voies respiratoires**

Il est connu que la structure des voies respiratoires des individus asthmatiques est modifiée comparativement à celle d'individus qui n'en sont pas atteints. En effet, le terme remodelage est utilisé pour désigner l'ensemble des changements structuraux observés au niveau des voies respiratoires des asthmatiques, que ce soit au niveau de l'épithélium bronchique ou au niveau des tissus sous-jacents comme le muscle lisse [39, 60]. Le déclenchement de la cascade inflammatoire chez les personnes asthmatiques entraîne le recrutement de cellules immunitaires ainsi que la libération de médiateurs chimiques qui enclenchent les différents mécanismes de ce remodelage. La Figure 4 ci-dessous illustre en détail l'implication des différentes cellules au processus de remodelage. Il est possible de constater une perte de l'intégrité de l'épithélium bronchique par un clivage des jonctions serrées retenant les cellules épithéliales les unes aux autres. La barrière physique que constitue l'épithélium bronchique se retrouve donc grandement fragilisée et permet plus facilement le passage de pathogènes ou d'allergènes [69]. Ceci pourrait donc contribuer à la persistance de l'asthme chez des individus où il y a une atteinte plus sévère puisqu'une réaction d'inflammation peut s'enclencher plus souvent et plus facilement [29]. Les cellules à gobelet qui sont les cellules sécrétrices de



l'épithélium bronchique peuvent également subir une hyperplasie [70]. Ce mécanisme, conjugué à une modification au niveau de la synthèse de la mucine, entraînera une hyperproduction de mucus chez les asthmatiques et obstruant davantage leurs voies respiratoires [69]. Les fibroblastes, situés sous l'épithélium bronchique, seront également sujets au remodelage. Il est en effet possible d'observer une prolifération de ces cellules en plus de se différencier en myofibroblastes [60]. Ceci entraîne donc en un épaissement de la paroi composant les bronches, diminuant le calibre des voies respiratoires [60]. Le muscle lisse fait également l'objet de modifications. Les cellules musculaires lisses subiront une hyperplasie ou encore une hypertrophie, modifiant leur structure et leur nombre pour ultimement augmenter la quantité de muscle lisse présent autour des bronches ainsi que sous le tissu épithélial [71, 72]. L'augmentation de muscle lisse dans l'asthme pourrait également être associée à la sévérité de la maladie et à sa durée [71].



**Figure 4. Processus de remodelage des voies respiratoires dans l'asthme.**

Au niveau de l'épithélium bronchique, les cellules épithéliales se détacheront et permettront l'entrée de cellules inflammatoires au niveau du tissu bronchique, occasionnant les différentes modifications structurales du tissu bronchique subséquentes. Les cellules à gobelet sécrétant le mucus tapissant les voies respiratoires subiront également des modifications importantes au niveau de leur structure et de leur fonction sécrétoire. Au niveau de la paroi bronchique, une accumulation de fibroblastes contribuera à l'épaississement du tissu bronchique. Dans la couche de tissu musculaire sous-jacente, les médiateurs inflammatoires occasionneront une angiogenèse ainsi qu'une modification des cellules musculaires lisses, contribuant aussi à l'épaississement du tissu bronchique.

## 2. Composante génétique

Dans l'effort de recherche déployé afin de mieux comprendre l'asthme et d'expliquer son développement, son mode de transmission a d'abord été étudié. En effet, il avait été mis en évidence que l'asthme était en effet développé chez les enfants issus de familles où ce trait était dans l'historique familial, mais que cela n'était pas vrai dans tous les cas [73]. Le mode de transmission envisagé n'était donc pas uniquement génétique et la tâche d'expliquer sa transmission et son développement s'avèrerait plus ardue que pour un trait monogénique [74]. Une étude imposante sur le développement de l'asthme chez des couples de jumeaux au début des années 70 a permis de révéler que l'asthme se développait près de 4 fois plus chez les jumeaux monozygotes (i.e. jumeaux issus d'un seul zygote et partageant le même génome) qu'hétérozygote (i.e. jumeaux issus de deux zygotes distincts et ne partageant pas le même génome), laissant ainsi présager que le bagage génétique partagé par ceux-ci pouvait expliquer son développement [75, 76]. Les études subséquentes sur les jumeaux monozygotes ont toutefois révélé que le statut d'asthme ne s'avère pas concordant dans environ 25% des cas, indiquant qu'un paramètre autre que la génétique doit intervenir dans le développement de l'asthme [77]. L'asthme a alors été considéré comme un trait complexe, c'est-à-dire une maladie multifactorielle qui ne peut s'expliquer que par des facteurs génétiques [78]. On sait maintenant que l'hérédité de l'asthme n'est expliquée qu'en partie par la composante génétique, jusqu'à hauteur de 60%, quoique cette valeur varie considérablement d'une étude à l'autre [73, 74]. L'environnement constitue une composante importante de l'asthme qui se développe en réponse à l'interaction entre des déterminants génétiques et environnementaux (GxE) [78]. L'exploration de ces deux composantes est nécessaire pour comprendre la grande hétérogénéité phénotypique que l'on observe chez les individus asthmatiques.

Dans un premier temps, des études de liaison génétique au sein de familles ont permis de mettre en évidence certains gènes de susceptibilité de l'asthme. Ces études reposent sur le marquage de certaines régions spécifiques de l'ADN et permettent d'évaluer quelles portions chromosomiques sont transmises à la descendance. Par contre, cette manière de faire est peu précise et les régions identifiées peuvent contenir plusieurs gènes différents. Il a toutefois été possible d'identifier plusieurs gènes avec cette méthode, dont *ADAM33* et *GPRA* qui ont été associés à une incidence plus élevée de l'asthme [79, 80]. Comme cette méthode était plutôt limitée en termes de précision, l'approche par gènes candidats a alors été privilégiée pour trouver de nouveaux loci associés à l'asthme. En effet,

cette méthodologie a permis de cibler des gènes spécifiques notamment selon leurs fonctions biologiques ou selon leur position chromosomique près d'un site ou dans un site précédemment identifié par liaison génétique [74]. Un autre avantage de cette méthode est qu'elle permet d'étudier les différences génétiques au niveau d'individus non apparentés (cas-contrôle) [77]. Grâce à cette approche, plus de 300 gènes de susceptibilité ont été associés à l'asthme [81]. Ceux-ci ont été regroupés dans quatre grandes catégories, soit 1) les gènes relatifs à l'immunité innée, 2) les gènes associés à la différenciation vers le type T<sub>H</sub>2 des CD4+, 3) les gènes de l'épithélium bronchique et finalement 4) les gènes associés aux manifestations de l'asthme (remodelage des voies respiratoires et sévérité) [82].

L'avancement technologique a permis la création d'approches plus puissantes et efficaces permettant de faire des études d'association pangénomique (*genome-wide association studies*; GWAS) [83]. En effet, cette technique permet de faire l'inventaire d'une grande quantité de polymorphismes d'un seul nucléotide, SNP, dispersés sur tout le génome afin de comparer leur fréquence et de déceler les variations associées à un trait [83, 84]. Ceci a été rendu possible grâce au *HapMap Project* qui a permis de construire un catalogue de plus de 35 millions de variations génétiques communes grâce au séquençage du génome complet de 2504 individus issus du *Thousand Genome Project* [85, 86]. Les études de type GWA permettent donc d'identifier de nouveaux gènes et de nouvelles voies de signalisation impliqués dans un trait, sans égard à leurs fonctions comme dans le cas des études par l'approche gènes candidats [82]. Les GWAS permettent donc d'expliquer les traits communs étudiés par des variants du génome qui sont communs dans la population générale [87]. Dans le contexte de l'asthme, l'ère GWAS a permis de valider plusieurs associations en plus d'en découvrir une myriade d'autres. Selon le site internet *GWAS Catalog*, un catalogue regroupant les études GWAS effectuées jusqu'à ce jour pour divers trait, 84 GWAS sur l'asthme et ses phénotypes associés ont été menés, permettant ainsi d'y associer près de 600 SNP différents [88]. On estime également que plus de 1000 gènes candidats ont été mis en lumière dans un contexte d'asthme grâce aux études de types GWAS notamment [89].

Le premier locus à avoir été identifié par l'approche GWAS était le 17q21 en 2007 [90]. Ce locus comprend 5 gènes différents soit *gasdermin A (GSDMA)*, *gasdermin B (GSDMB)*, *IKAROS family zinc finger 3 (IKZF3)*, *ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3 (ORMDL3)* et *zona pellucida*

*binding protein 2 (ZPBP2)*. Plusieurs études de type GWAS ont permis d'appuyer l'association de ce locus dans l'asthme et les traits lui étant associés (l'allergie par exemple) et de démontrer son importance comme facteur de risque, autant lors de l'étude d'une seule population que dans des méta-analyses (i.e. analyses combinant les résultats de plusieurs études) [91-98]. L'association de ce locus à l'asthme a été la plus répliquée jusqu'à ce jour dans plusieurs types de population, incluant la collection familiale d'asthme du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) qui est la population à l'étude dans le présent mémoire et dont il sera question dans la section 4 [99, 100]. Toutefois, il est difficile de savoir quels SNP associés ont le plus d'influence dans l'asthme étant donné que les gènes de ce locus sont en fort déséquilibre de liaison, signifiant que leurs allèles sont transmis ensemble [74]. Une autre région souvent mise en évidence dans l'asthme est le gène *IL33* situé en position 9p24. Celui-ci a été associé dans deux consortiums différents (GABRIEL et EVE) en plus d'être constamment associé dans des populations d'ethnies différentes dont caucasienne, afro-américaine, hispanique et asiatique [92, 93, 101]. Contrairement aux gènes du locus 17q21, *IL33* est un gène dont l'implication biologique dans l'asthme est bien connue. En effet, la protéine produite par ce gène est une cytokine pro-inflammatoire qui a un rôle central dans la réponse asthmatique [29]. Le gène *interleukin 1 receptor like 1 (IL1RL1)* codant pour son récepteur a aussi été associé à l'asthme [102]. Les loci 17q12-21 et 9p24 ne représentent que deux exemples de la grande quantité de loci associés à l'asthme à ce jour.

De nombreux gènes ont été identifiés par l'approche GWAS mais le problème de la réplication persiste. Il est en effet difficile et hasardeux d'affirmer l'implication d'un SNP dans l'asthme lorsqu'une seule étude rapporte une association significative. Les corrections statistiques appliquées dans l'analyse des données GWAS peuvent aussi masquer certaines associations plus faibles, mais ayant un impact important dans le développement de l'asthme [103]. Les techniques de *whole genome sequencing* (WGS) permettent maintenant de pallier à certains problèmes des GWAS en répertoriant toutes les variations présentes sur le génome, sans toutefois éliminer le besoin de répliquer les résultats obtenus. Ainsi, il est possible d'étudier la fréquence des variants communs, comme pour les GWAS, en plus des variants rares et de la variabilité du nombre de copie des gènes qui pourraient permettre d'expliquer une plus grande partie de l'hérédité de ce trait. Une telle étude a déjà été faite dans un contexte d'asthme au niveau d'une population hutérienne des États-Unis [104].

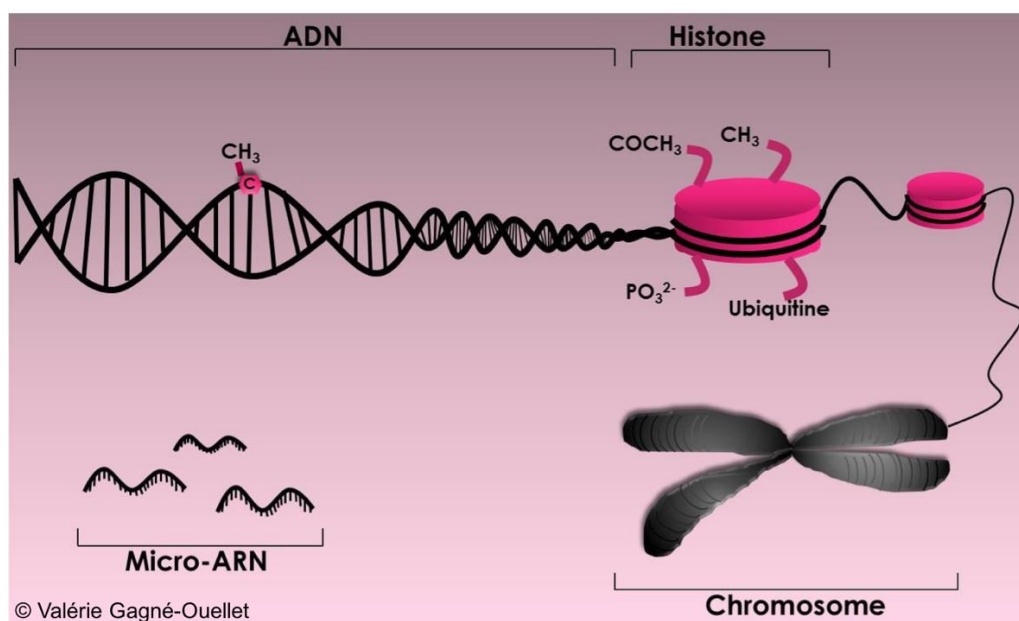
### 3. Composante environnementale

Il est maintenant bien connu que plusieurs composantes de l'environnement peuvent avoir une incidence sur l'asthme. Au niveau moléculaire, il est difficile de savoir exactement l'influence de chacun. Toutefois, il est possible d'étudier une part de l'impact de l'environnement sur le génome par l'étude de modifications épigénétiques. Ces modifications de l'ADN causées par des facteurs environnementaux qui sont réversibles et transmissibles pourraient expliquer une part de l'héritabilité manquante dans l'asthme. L'étude épigénétique dans l'asthme permet de documenter l'interaction entre la portion génétique et environnementale de l'asthme et de mieux comprendre la biologie du trait.

#### 3.1 Épigénétique

Le terme épigénotype a été utilisé pour la première fois en 1942 afin de désigner les changements du phénotype survenant sans changement au génotype [105]. Popularisé dans les années 1990, le terme épigénétique a reçu sa définition officielle en 2008 et se définit comme un « phénotype héritable stable résultant de changements dans les chromosomes sans altération à la séquence d'ADN » [106]. Cette discipline concerne donc toutes les modifications apposées sur l'ADN qui n'altèrent pas sa séquence nucléotidique, mais ayant un impact sur l'expression des gènes [107]. Ces modifications seraient induites et modulées par les différents facteurs environnementaux auxquels l'homme est exposé [108]. On sait maintenant que l'épigénétique n'est pas un « phénotype héritable stable » puisque les marques épigénétiques sont dynamiques dans le temps et qu'elles ne sont par conséquent pas identiques tout au long de la vie, en plus d'être réversibles [109, 110]. Également, ces marques peuvent être héréditaires d'une génération à l'autre [111]. Il existe plusieurs types de mécanismes épigénétiques agissant tous à titre de régulateur de l'expression génique et classés en trois grandes catégories : 1) les modifications au niveau des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination), 2) les micro-ARN (miARN) et 3) la méthylation de l'ADN [22, 107, 108, 111]. La Figure 5 représente ces trois types de mécanismes. Les modifications de la structure des histones ainsi que la méthylation de l'ADN peuvent modifier l'accès au site d'initiation de la transcription (TSS) au niveau des gènes ou encore agir sur le recrutement de molécules agissant comme répresseurs de la transcription [112]. La transcription du gène en ARN messager (ARNm) sera alors augmentée ou diminuée selon le contexte [113]. Comme l'ARNm est un canevas de base pour générer la protéine correspondante, le niveau de cette protéine sera ultimement modifié lui aussi [113]. C'est à

ce niveau que des impacts fonctionnels peuvent survenir et modifier les mécanismes normaux des cellules et de l'organisme. Le mécanisme d'action des miARN est plutôt différent étant donné que celui-ci agira directement sur les molécules d'ARNm synthétisées par le processus de transcription [114]. Les miARN se lieront complémentaires aux molécules d'ARNm afin d'entraîner leur dégradation, diminuant ainsi la quantité de molécules nécessaires pour la traduction en protéine [114]. Le présent mémoire se concentrera plus spécifiquement sur la méthylation de l'ADN étant donné qu'il s'agit de la marque épigénétique la plus étudiée à ce jour [110]. En effet, il existe une relation fonctionnelle bien documentée entre la méthylation de l'ADN et l'expression des gènes et son étude ne requiert que de l'ADN, une molécule facilement isolable à partir de tissus biologiques comme le sang complet [115]. Le concept de méthylation de l'ADN sera abordé plus en détail dans la section suivante puisque les données épigénétiques recueillies dans ce mémoire ne concernent que la méthylation de l'ADN.



**Figure 5. Les différentes catégories de mécanismes épigénétiques.**

Au niveau de l'ADN, le mécanisme de méthylation se traduit par l'ajout d'un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) au niveau des cytosines. Les histones sont des protéines autour desquelles l'ADN s'enroulera pour former les chromosomes. À ce niveau, certains groupements chimiques peuvent venir s'y fixer et correspondre à différents types de modifications des histones (méthylation : CH<sub>3</sub>, acétylation : COCH<sub>3</sub>, phosphorylation : PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, ubiquitination : ubiquitine). Finalement, les micro-ARN (miARN) sont des molécules non codantes d'ARN se fixant complémentaires aux molécules d'ARN messager (ARNm) pour modifier le processus de traduction en protéine. Ultiment, chacun de ces mécanismes agira comme régulateur de l'expression des gènes.

### 3.1.1 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est à ce jour la marque épigénétique la plus étudiée et par conséquent la plus connue, puisque les méthodes utilisées pour étudier ces marques sont relativement simples, accessibles et peu coûteuses [107]. Concrètement, la méthylation de l'ADN correspond à l'ajout d'un groupement méthyle ( $\text{CH}_3$ ) au niveau de certains nucléotides de l'ADN [108]. Préférentiellement, ces groupements se fixeront aux cytosines (C) étant précédées d'une guanine [108]. Ce type d'arrangement sera désigné comme un site CpG pour cytosine-phosphate-guanine [116]. L'ajout du groupement méthyle se fait au niveau du cinquième carbone du C grâce à l'action d'une enzyme DNMT [107].

Au niveau de l'ADN, les sites CpG peuvent se regrouper dans des zones précises d'au moins 200 paires de bases que l'on désigne comme des îlots CpG, où les CpG constituent 50% de ce site [109, 117]. Quantitativement, 60% de ces îlots se retrouvent dans les régions promotrices des gènes, suggérant un impact important de la méthylation de l'ADN sur le processus de transcription de l'ADN vers l'ARNm [107, 118]. Il est question d'une hyperméthylation lorsqu'il y a un ajout de groupements méthyles. Cet ajout au niveau de sites CpG du promoteur d'un gène empêchera la fixation des facteurs de transcription au niveau des sites d'initiation de la transcription [119]. Le contraire est également possible dans le cas où il y aurait une méthylation moindre, une hypométhylation, au niveau du TSS [119]. Les régions régulatrices, également impliquées dans le contrôle de la transcription des gènes, peuvent également être méthylées et modifier le niveau de transcription du gène [119]. Ces régions agissent directement sur les régions promotrices et une modification épigénétique à ce niveau peut avoir un impact sur les processus subséquents [120]. La méthylation de l'ADN peut également interagir avec certains SNP, apportant encore une fois certaines modifications au processus transcriptionnel [120].

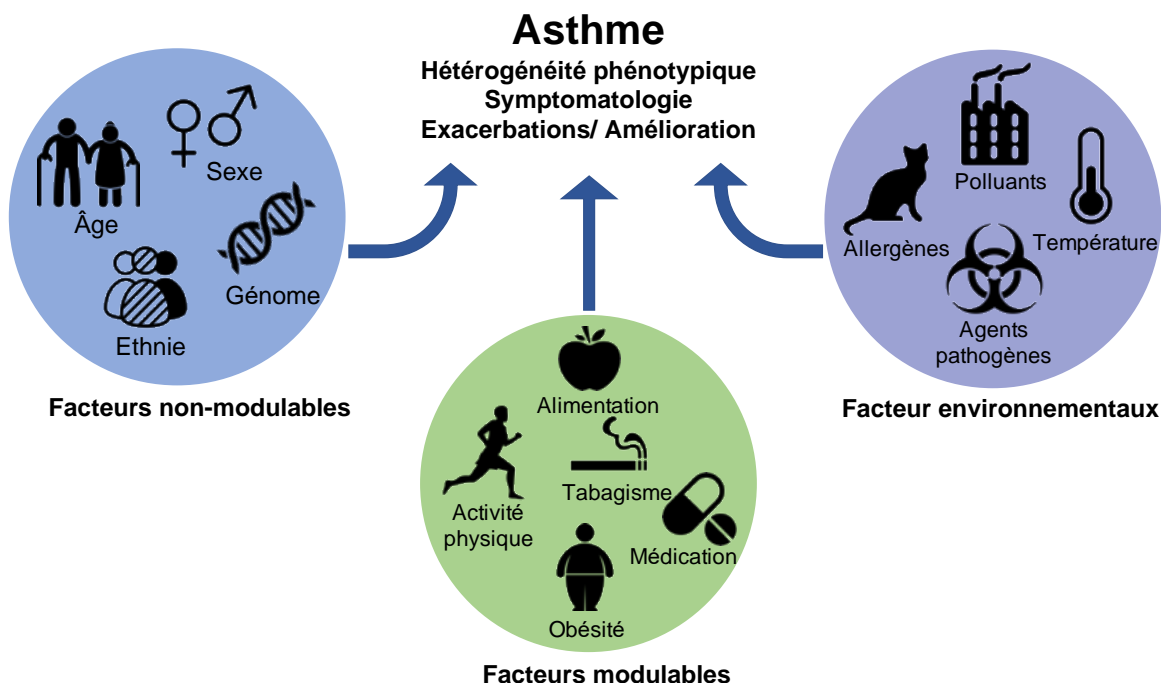
L'étude de la méthylation de l'ADN dans l'asthme permet d'explorer la portion inexpliquée de cette maladie par les facteurs génétiques. Jusqu'à maintenant, un contrôle épigénétique a été mis en évidence au niveau du processus de différenciation des lymphocytes T  $\text{CD4}^+$ , plus particulièrement le type  $\text{T}_\text{H}2$  associé aux allergies et à l'asthme [121]. Une sensibilisation allergénique chez des individus asthmatiques a été associée à une diminution de la méthylation au niveau du promoteur des gènes codant pour l'IL-4 et l'IFN $\gamma$  [122]. De plus, une étude de Brand et collègues sur des souris s'est



intéressée à la méthylation au niveau de loci codant pour des cytokines exprimées par les cellules de type  $T_H1$  et  $T_H2$  [123]. Ils ont mis en évidence une augmentation de la méthylation du promoteur du gène *IFNG*, codant pour l' $IFN_\gamma$ , suite à une sensibilisation allergénique [123]. Les études d'associations apportent également de l'information sur l'épigénétique de l'asthme [124]. Notamment, il a été rapporté que la méthylation des promoteurs des gènes *GSDMA*, *ZPBP2* et *SLC22A5* était influencée par le génotype local [125]. Cet effet était dominant au niveau des gènes *GSDMA* et *ZPBP2* chez les asthmatiques possédant des allèles de susceptibilités, deux gènes dont certains SNP sont associés à l'asthme [125]. Une autre étude de type EWAS (epigenome-wide association study), qui évalue les différences de méthylation sur tout le génome, a mis en évidence une méthylation plus faible au niveau de certains gènes dans des échantillons d'éosinophiles d'asthmatiques ayant un haut taux d'IgE sérique [126]. Il est donc certains que la méthylation de l'ADN, au même titre que les autres mécanismes épigénétiques, a le potentiel de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques qui agiront directement sur le contrôle de la transcription des gènes.

### 3.3 Facteurs de risque

Comme il a été mentionné plus tôt, l'asthme est un trait complexe résultant d'une portion génétique et d'une portion environnementale. Cette section sera par conséquent consacrée aux facteurs de risques ayant été associés à l'asthme puisque ceux-ci peuvent influencer son développement ou encore constituer un élément déclencheur des symptômes. Seulement quelques-uns seront mentionnés ci-dessous, mais il est important de savoir qu'il en existe une grande quantité qui peuvent être modulables ou non ou encore environnementaux (Figure 6).



**Figure 6. Facteurs de risque de l'asthme.**

L'asthme résulte d'une interaction entre différents facteurs de risque spécifiques à l'individu et qui influenceront le développement de l'asthme ainsi que ses différentes manifestations et son évolution dans le temps. Les facteurs de risque en lien avec l'individu peuvent être modifiables (comportement et habitudes de vie) ou non modifiables (sexe, ethnie ou encore l'âge). Il est important de comprendre que les particularités génétiques de chaque individu sont également un facteur de risque non modifiable important. Les expositions environnementales sont également des facteurs de risques qui peuvent permettre d'expliquer et de mieux comprendre le développement et l'évolution de l'asthme. Les facteurs représentés dans la présente figure ne constituent qu'un aperçu de ceux-ci.

### 3.3.1 Âge et sexe

Il est maintenant connu que l'âge et le sexe sont des facteurs étroitement liés à l'histoire naturelle de l'asthme puisqu'il s'agit d'une maladie dont les manifestations peuvent changer grandement au fil du temps [1, 127]. Il est documenté que l'asthme est la maladie chronique la plus courante chez les enfants mais qu'avec l'âge, une diminution des symptômes et même une rémission peut être observée [2, 127]. Il est toutefois possible que les symptômes se déclenchent plus tard dans la vie adulte. Dans ces cas, le type d'asthme est plutôt extrinsèque et les mécanismes physiopathologiques y étant associés, notamment au niveau du déclenchement des symptômes, seront différents [4]. La prévalence plus élevée de l'asthme chez les femmes pourrait être expliquée par une différence de susceptibilité aux différentes expositions environnementales telles que l'exposition à la fumée de tabac ou à l'ozone dans l'environnement qui affecterait davantage les femmes [128]. Une étude de Naumova et collègues, réalisée sur la cohorte du SLSJ a notamment permis de

mettre en évidence des différences au niveau de la méthylation de l'ADN selon le sexe et également selon l'âge [129]. Les mécanismes épigénétiques changeant selon l'âge et le sexe pourraient donc aussi contribuer aux différences dans l'évolution de la maladie. Il est également probable que la production d'œstrogène chez la femme puisse induire une réaction inflammatoire dans l'organisme pouvant intervenir dans le développement et la persistance de l'asthme [130]. Une étude de 2008 a démontré que les femmes étaient plus susceptibles de présenter de l'hyperréactivité bronchique, et que cette différence était probablement associée à la production d'œstrogène réduite après l'adolescence [130].

### **3.3.2 Obésité**

L'obésité est également un facteur de risque qui aura un impact à la fois sur le développement de la maladie et sur le phénotype [7, 131]. L'indice de masse corporelle (IMC) est une mesure qui a été souvent associée au risque de développer de l'asthme [132]. Une méta-analyse de plusieurs études sur le sujet a effectivement rapporté un effet dose-réponse de l'IMC sur l'incidence de l'asthme chez des adultes en surpoids ou obèses [133]. Le risque de développer de l'asthme est donc accru avec une augmentation de l'IMC [133]. Encore selon une méta-analyse, l'obésité durant l'enfance est également associée à une incidence plus élevée de l'asthme infantile alors que le risque de développer cette condition est réduit chez les enfants ayant un poids sous la normale [134]. L'obésité entraînera plusieurs changements au niveau de la fonction pulmonaire, plus particulièrement au niveau des volumes respiratoires comme la capacité résiduelle fonctionnelle, le volume de réserve expiratoire ou le ratio VEMS<sub>1</sub>/CVF, ce qui peut contribuer au développement de l'asthme [131, 132, 135]. Une inflammation systémique est également observable chez les individus obèses, marquée notamment par une augmentation du facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et de l'interleukine 6 (IL-6) en plus d'une quantité augmentée de cellules immunitaires comme les macrophages dans le tissu adipeux [1, 136, 137]. Cette inflammation pourrait donc aussi agir sur le développement de l'asthme.

### **3.3.3 Qualité de l'air**

Dans les années 80, on s'est intéressé à la différence dans la prévalence de l'asthme entre les milieux ruraux et urbains et diverses études ont depuis démontré que la prévalence de l'asthme était plus élevée chez les individus vivant dans des zones urbaines [131]. Le même constat a été fait

au Canada dans une étude de Lawson et collègues menée sur des enfants asthmatiques [138]. L'urbanisation et l'industrialisation sont en lien direct avec la pollution environnementale qui constitue également un facteur pouvant mener à des exacerbations d'asthme, mais aussi influencer la sévérité des symptômes [139]. La croissance rapide des zones urbaines est associée à une augmentation de la pollution environnementale et selon une revue de 2014, le fardeau global de l'asthme s'en trouvera augmenté dans les années à venir [139]. L'exposition à un milieu agricole constitue également un facteur de risque à prendre en compte puisqu'il s'agirait d'un facteur protecteur pour cette condition [140].

L'environnement de travail peut aussi être considéré comme un facteur de risque important de l'asthme. Ce type d'asthme, l'asthme occupationnel, est relié à l'exposition à différentes molécules dans l'air que l'on divise en deux grandes catégories, soit les composés de poids moléculaires élevés (HMW de l'anglais *high molecular weight*) (farine, colles industrielles, tabac, allergènes dérivés d'animaux, de plantes ou de poissons et de fruits de mer) ou de poids moléculaires faibles (LMW de l'anglais *low molecular weight*) (anhydride d'acides, métaux, produits chimiques volatiles) [7, 141]. Notamment, les concierges ou les femmes de ménage sont plus à risque de développer de l'asthme occupationnel dû aux différents nettoyants renfermant beaucoup d'agents LMW, en plus d'être fortement exposés à des allergènes domestiques [142]. D'autres métiers sont répertoriés où le risque de développer de l'asthme occupationnel est plus élevé dont notamment les pâtisseries et les boulangers, les travailleurs de l'industrie alimentaire et de l'industrie du bois, les coiffeurs, les fermiers et les travailleurs du domaine de la santé qui sont soumis aux composés HMW majoritairement [141].

Les microorganismes, bactéries ou virus, présents dans l'air représentent également un facteur de risque important pouvant influencer la pathophysiologie de la maladie puisque les individus atteints d'asthme sont plus susceptibles d'être infectés par ces microbes dus aux atteintes des voies respiratoires entraînées l'asthme [7]. Notamment, l'infection par le virus respiratoire syncytial, responsable de la majorité des cas d'infections respiratoires chez les enfants, est associée au développement de l'asthme et à ses exacerbations [1, 143]. Une respiration sifflante induite par des rhinovirus chez les enfants pourrait aussi constituer un prédicteur du développement de l'asthme plus tard dans la vie [143].

### **3.3.4 Tabagisme**

L'exposition, passive ou active, aux composants de la fumée de cigarette est reconnue comme ayant un impact important sur le système immunitaire, notamment en perturbant les fonctions normales des cellules immunitaires et en compromettant l'intégrité de l'épithélium bronchique, la première ligne de défense de l'organisme [144]. Par conséquent, la fumée de cigarette a également un impact sur le développement de l'asthme, particulièrement le tabagisme passif chez les enfants à naître ou durant la petite enfance [144]. En effet, une méta-analyse de 2012 a révélé que le risque de développer de l'asthme chez ces enfants exposés était entre 21 et 85% supérieur et où le 85% d'augmentation correspond à une exposition prénatale [145]. Une autre étude a également mis en évidence une incidence d'asthme plus élevée chez des adolescentes dont la mère avait fumé plus de 20 cigarettes par jour durant la grossesse [146]. Les symptômes d'asthme chez les fumeurs actifs sont également plus graves et peuvent mener à une limitation irréversible du flux d'air acheminé aux poumons ou à des infections respiratoires plus fréquentes qui contribuent à aggraver les symptômes [144].

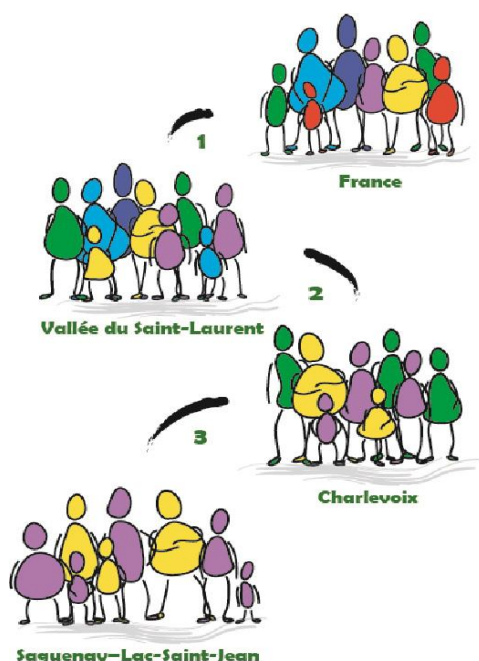
## **4. Population à l'étude**

Les individus recrutés dans le présent projet font partie de la Cohorte familiale d'asthme du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ), qui porte ce nom puisqu'elle est composée d'individus asthmatiques et de leur famille originaire de la région du SLSJ [147]. Cette section résume l'histoire du peuplement du SLSJ, les critères d'admissibilités à l'étude et le profil phénotypique relié à l'asthme et aux conditions associées à l'asthme dans cette cohorte familiale apparentée à au moins une personne asthmatique allergique.

### **4.1 Historique**

Connaitre brièvement l'historique du peuplement de la région du SLSJ est indispensable afin de bien saisir les caractéristiques génétiques particulières de cette population. Dans un premier temps, la colonisation de la Nouvelle-France par près de 10 000 immigrants d'origine française au niveau de la vallée du Saint-Laurent s'est effectuée à partir de la création de la ville de Québec au début du 17<sup>e</sup> siècle jusqu'à la conquête britannique du territoire en 1763 [147, 148]. Même si l'immigration d'origine française a considérablement diminué par la suite, le fort taux de natalité chez les colons déjà établis sur le territoire a permis une augmentation démographique importante de la population canadienne-

française principalement dans les régions de Québec, Montréal et Trois-Rivières [149, 150]. Cette première vague d'immigration de la France vers la Nouvelle-France représente un premier effet fondateur (Figure 7). Ce phénomène correspond à la création d'une nouvelle population à partir d'un sous-ensemble d'individus d'une population mère plus vaste [151]. Ainsi, la diversité génétique de la nouvelle population se retrouve restreinte par rapport à la population mère puisque seulement une portion du bagage génétique de la population mère s'y retrouve [151]. Comme le bagage génétique est plus restreint, cette population est donc plus homogène d'un point de vue génétique qu'une population dite cosmopolite où l'apport génétique en allèles différents et nouveaux est constant et beaucoup plus fréquent [152].



**Figure 7. Schématisation du triple effet fondateur caractérisant la population du SLSJ.**

Le schéma représente une population d'origine très colorée (France) et donc génétiquement hétérogène. Les trois effets fondateurs successifs, correspondant à trois migrations d'un sous-groupe d'individus à partir d'une population d'origine. Ceci résulte en une perte de diversité génétique, exprimé ici par une population finale moins colorée ou plus homogène (Saguenay-Lac-Saint-Jean, SLSJ). La population du SLSJ est donc plus homogène génétiquement que la population mère française [151].

Une deuxième vague de migration des Canadiens-français vers la région de Charlevoix à la fin du 17<sup>e</sup> siècle s'est produite puisque les terres cultivables manquaient [148, 150]. Il s'agit donc d'un deuxième effet fondateur qui s'ajoute au premier déjà subi par cette population. Finalement, l'accroissement de la population combiné à une fertilité faible des terres agricoles autour de 1830 força

l'ouverture de nouvelles régions, dont le SLSJ, où des familles migrèrent en quête de meilleures terres dès 1838 [149, 153]. Ce dernier mouvement migratoire d'une portion de la population de Charlevoix vers la région du SLSJ représente un troisième effet fondateur. Ces trois épisodes de migration successifs et rapprochés dans le temps ont donc donné lieu à une population à triple effet fondateur relativement jeune, puisque sa création remonte à seulement 179 ans [153].

#### **4.2 La cohorte familiale d'asthme du Saguenay–Lac-Saint-Jean**

Travailler avec ce type de population, soit une population à effet fondateur, permet d'avoir un paysage génétique plus uniforme. En d'autres termes, une telle population présente une plus grande homogénéité génétique soit une plus grande uniformité comparativement à une population dite cosmopolite où l'apport génétique est plus diversifié [152]. Il faut toutefois comprendre qu'homogène ne signifie pas similaire. Il ne faut donc pas confondre cette caractéristique avec le coefficient de consanguinité. En effet, ce coefficient peut être calculé pour mesurer le taux d'apparement entre les individus d'une même population et d'y mettre en évidence les unions entre individus issus de la même famille [111]. Il est important de le préciser puisque le coefficient de consanguinité proche des individus du SLSJ est comparable aux valeurs obtenues pour les autres régions du Québec contrairement à ce que laisse entendre la croyance populaire [154]. Cette homogénéité génétique est donc attribuable au triple effet fondateur et au haut taux de fécondité de la population qui a permis son accroissement rapide.

La cohorte familiale d'asthme du SLSJ a été construite à partir de 1997 et le recrutement initial s'est amorcé en 1999, à la suite de la mise en place du profil expérimental et de l'approbation des documents éthiques pour les personnes majeures et mineures. L'évaluation des participants s'est étendue jusqu'en 2002 [147]. Cette cohorte a été bâtie grâce au recrutement de participants asthmatiques, soit les probands, ainsi qu'aux membres de leurs familles; d'abord les individus apparentés de premier degré (famille nucléaire), puis la famille élargie lorsque ceux-ci souhaitaient participer. Au total, la cohorte comprend donc 394 individus répartis en 271 familles multigénérationnelles différentes comptant au moins 2 générations et un maximum de 4. Les parents des individus asthmatiques devaient impérativement faire partie de la cohorte pour que chaque famille comprenne un trio et au moins 2 générations. Pour chacun des participants, des échantillons de sang ont été recueillis en plus de recueillir des informations sur leur santé générale et respiratoire puis leurs

habitudes de vies à l'aide de questionnaires standardisés modifiés de l'*American Thoracic Society* (ATS). Le statut asthmatique des individus a été déterminé grâce à des tests de la fonction respiratoire (provocation bronchique à la métacholine, spirométrie avant et après inhalation d'un bronchodilatateur (pré-, post-BD)). Le statut allergique a également été déterminé grâce à un test d'allergie cutané à la piquûre. Il a donc été possible de recueillir plus de 200 caractéristiques qualitatives ou quantitatives pour la majorité des participants de la cohorte. Certaines sont présentées dans le Tableau 1 suivant. Il est important de mentionner que les données sont disponibles que pour 1214 individus puisque certains participants ont refusé de participer à certaines portions du processus de recrutement. Néanmoins, il s'agit d'une cohorte bien documentée en termes de caractéristiques phénotypiques. Les informations et les échantillons biologiques recueillis ont notamment permis l'utilisation de cet échantillon dans l'étude d'autres traits qui ne sont pas associés à l'asthme ou à l'allergie. À titre d'exemple, la cohorte familiale d'asthme du SLSJ a été utilisée en 2015 dans une étude sur les troubles bipolaires [155].

**Tableau 1. Table phénotypique de la collection familiale d'asthme du SLSJ.**

	Tous (n= 1214)	Probands (n= 240)	Autres membres de la famille		
			Tous (n= 974)	Sans asthme (n= 615)	Avec asthme (n= 353)
<b>Ratio M:F</b>	1:1,17	1:1,14	1:1,18	1:1,12	1:1,34
<b>Âge</b> , moyenne (écart)	38 (0-93)	17 (3-62)	43 (0-93)	46 (3-93)	39 (2-83)
<b>Tabagisme</b> , n (%)					
Non fumeur	646 (54)	202 (86)	444 (46)	259 (43)	182 (52)
Ex-fumeur	314 (26)	9 (4)	305 (32)	204 (34)	100 (29)
Fumeur	235 (20)	25 (11)	210 (22)	142 (23)	68 (19)
<b>Tabagisme passif</b> , n (%)					
Enfance	280 (61)	121 (60)	159 (63)	76 (56)	81 (70)
In utero	113 (22)	57 (28)	56 (18)	28 (17)	27 (20)
<b>IMC<sup>1</sup></b> , moyenne (écart)					
Enfant	20,2 (4,5)	20,1 (4,1)	20,4 (4,8)	20,6 (5,2)	20,1 (4,3)
Adulte	26,2 (4,8)	25,1 (4,7)	26,4 (4,8)	26,3 (4,7)	26,5 (4,9)
<b>VEMS<sub>1</sub><sup>2</sup></b> , % préd. (écart)	94 (43)	93 (35)	95 (45)	99 (48)	88 (38)
<b>CP<sub>20</sub><sup>3</sup></b> , (écart)	6,85 (5,2)	2,34 (3,45)	9,31 (5,06)	19,2 (3,61)	3,14 (4,35)
<b>IgE<sup>4</sup></b> , (écart)	125 (5)	233 (5)	105 (5)	79 (4)	165 (5)
<b>Sévérité asthme</b> , n (%)					
Intermittent	168 (31)	71 (31)	97 (31)	0 (0)	97 (31)
Modéré	292 (54)	130 (56)	163 (52)	0 (0)	163 (52)
Sévère	85 (16)	31 (13)	54 (17)	0 (0)	54 (17)
<b>Allergie</b> , n (%)					
Avec asthme, n(%)	427 (35)	189 (80)	239 (25)	0 (0)	239 (25)

<sup>1</sup> Indice de masse corporelle (IMC) calculée pour 907 sujets (201 probands et 706 membres de la famille (417 sans et 286 avec asthme)). <sup>2</sup> Moyenne du volume expiratoire forcé en 1 seconde (VEMS<sub>1</sub>) calculé en % de la valeur prédite pour 931 sujets (207 probands, 724 membres de la famille (422 sans et 299 avec asthme)). <sup>3</sup> Concentration de métacholine induisant une chute de 20% du VEMS<sub>1</sub> (CP<sub>20</sub>) pour 903 sujets (201 probands et 702 membres de la famille (421 sans et 277 avec asthme)). <sup>4</sup> Moyenne de la concentration d'immunoglobuline E (IgE) dans le sérum calculée pour 1012 sujets (226 probands et 786 membres de la famille (468 sans et 314 avec asthme)).



## 5. Hypothèse et objectifs

L'asthme est une maladie respiratoire chronique commune qui affecte une grande portion de la population, dont 2,4 millions d'individus seulement au Canada [3]. Comme sa prévalence ne cesse d'augmenter, cette condition représente un enjeu majeur de santé publique puisque les coûts y étant associés sont élevés [2, 5]. La physiopathologie de cette maladie est relativement bien décrite, mais l'étiologie de la maladie reste plus difficile à expliquer. En effet, l'asthme est un trait complexe résultant d'interactions gènes-environnement. L'étude de la portion génétique de l'asthme, notamment grâce à l'ère GWAS, a permis d'identifier près de 1000 gènes de susceptibilités [89]. L'héritabilité de l'asthme peut donc être estimée à hauteur de 60%, ce qui en laisse une large portion inexpliquée [73]. C'est à ce niveau que l'étude des déterminants environnementaux peut permettre de mieux comprendre le développement de l'asthme. Cette portion comprend des facteurs propres à l'individu (âge, sexe, etc.) ou encore des expositions auxquels ceux-ci sont soumis (pollution, alimentation, tabagisme, etc.) et les habitudes de vie (pratique d'activités physiques, activités cognitives, etc.). Les mécanismes épigénétiques, dont la méthylation de l'ADN, permettent de visualiser l'impact de ces facteurs dans l'asthme [156].

La méthylation de l'ADN étant spécifique à chaque type cellulaire, il est donc nécessaire d'investiguer au niveau de cellules impliquées dans les processus pathologiques de l'asthme. Les CD4<sup>+</sup> sont en effet des acteurs importants relayant le signal inflammatoire par la sécrétion de divers médiateurs et le recrutement d'autres cellules immunes lorsque différenciées en différents sous-types [35]. Une telle étude a donc le potentiel de permettre une meilleure compréhension de l'impact de la méthylation sur la fonction de ces cellules dans l'asthme.

Les objectifs de la présente étude étaient donc de :

- 1- Caractériser le patron de méthylation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans l'asthme et l'asthme allergique sur un échantillon de participants de la cohorte canadienne-française sur les troubles respiratoires et l'allergie;
- 2- Caractériser le patron d'expression des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans l'asthme et l'asthme allergique sur un échantillon de participants de la cohorte canadienne-française sur les troubles respiratoires et l'allergie.

# CHAPITRE 1 – MÉTHODOLOGIE

## 1.1 Recrutement des participants

Un sous-groupe de la biobanque d'asthme du Saguenay–Lac-Saint-Jean a été recruté pour ce projet. En effet, les individus contactés pour participer à ce projet faisaient partie de la biobanque depuis sa création à la fin des années 2000. Ceux-ci sont répartis soit en duos discordants pour le statut d'asthme, c'est-à-dire une fratrie dont un des individus est asthmatique et l'autre ne l'est pas, ou en trio, soit un couple de parents, sans regard à leur phénotype d'asthme, ainsi que leur enfant biologique atteint d'asthme. Les participants acceptant cette nouvelle participation ont été rencontrés à la clinique Ecogène-21 de 2015 à 2016 pour un prélèvement sanguin de 200ml fait par une infirmière de recherche. Cette quantité de cellules a été décidée sur la base des optimisations de la méthode d'isolation des cellules. En effet, les éosinophiles du même échantillon sanguin étaient isolés simultanément aux lymphocytes T CD4+. Ces granulocytes ne comptent que pour 1 à 3% des globules blancs. Il est donc nécessaire d'avoir une quantité de sang de départ plus grande afin d'en avoir une quantité suffisante pour mener divers protocoles épigénétiques et transcriptomiques [157].

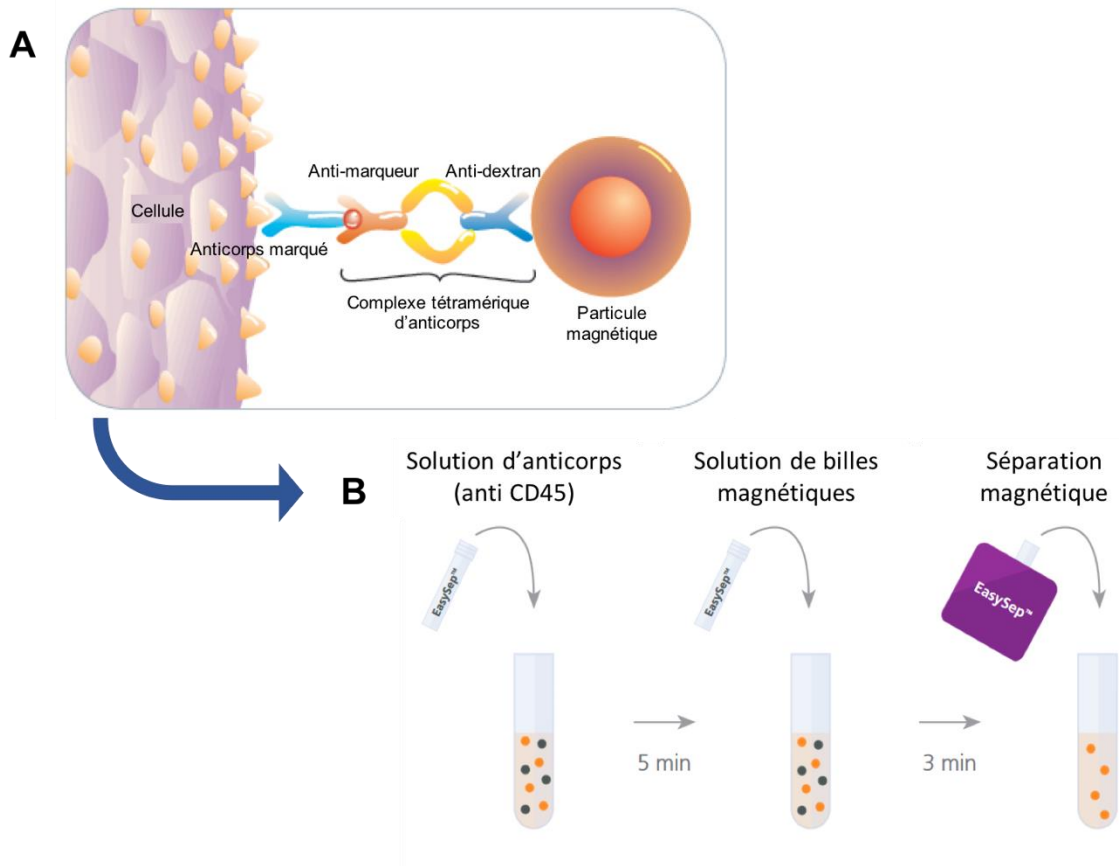
En plus d'un échantillon sanguin, chaque participant était interrogé sur sa santé respiratoire ainsi que sa santé en générale et son environnement dans un questionnaire mené par une personne de l'équipe de la biobanque (moi-même et Lucile Pain, ancienne étudiante au doctorat en biologie). Ce questionnaire de plus de 100 questions a permis de recueillir les dernières données autorapportées par les participants afin de mettre à jour les informations recueillies depuis le recrutement initial.

## 1.2 Isolation des lymphocytes T CD4+

L'échantillon sanguin de 200ml était rapporté au laboratoire une à deux heures suivant le prélèvement afin de procéder à l'isolation des cellules afin d'éviter l'activation des cellules sanguines, ce qui donnerait une quantité de cellules plus faible à la fin du protocole. Une première centrifugation a permis de retirer le plasma de l'échantillon. Par la suite, la méthode de séparation au gradient de Ficoll a été utilisée pour recueillir les fractions cellulaires séparées. Ce tampon, composé de molécules denses de polysaccharides diluées en solution aqueuse, permet d'isoler les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) puisque leur densité est plus faible que celle du Ficoll [158]. Comme les

granulocytes ont une densité plus élevée, ceux-ci se retrouvaient dans le culot du tube lors de la centrifugation alors que les cellules mononuclées flottaient au-dessus du Ficoll. Les deux fractions ont donc pu être séparées et purifiées séparément. Il ne sera ici question que du protocole d'isolation des lymphocytes T CD4+. La fraction cellulaire d'intérêt a été lavée avant de procéder à une sélection négative par des anticorps anti-CD45 couplés à des billes magnétiques selon le protocole du *EasySep™ Human Naïve CD4+ T Cell Isolation Kit* (Stemcell, Vancouver, CB, Canada), et retenues par un aimant (« *The Big Easy* » *EasySep™Magnet*, Stemcell). Le principe moléculaire y est montré dans la Figure 8. En résumé, un anticorps spécifique, anti-CD45 dans ce cas-ci, a été mis en solution et s'est lié aux cellules exprimant cet antigène. La quantité totale d'anticorps utilisée dépend de la quantité de cellules comptées avec un hématimètre. Ce comptage permettait également de vérifier à l'œil la présence de contamination par d'autres types cellulaires comme les granulocytes ou les monocytes. Par la suite, un complexe tétramérique fait d'un anticorps spécifique au premier anticorps et d'un anticorps lié à une bille magnétique a été mis en solution pour qu'il s'attache à l'anticorps anti-CD45. Lorsque le tube contenant la solution cellulaire avec les cellules maintenant liées à une bille magnétique a été mis dans un aimant, celles-ci ont été retenues sur la paroi du tube alors que les cellules en suspension n'exprimant pas le CD45 ont été séparées.

Les lymphocytes T CD4+ isolés ont ensuite été comptés à grâce au compteur automatisé de cellules *Orflo's Moxi Z Mini* (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Environ 2 millions de cellules ont été conservées à -80°C pour l'isolation de l'ADN et la même quantité pour l'isolation de l'ARN total.



**Figure 8. Principe de la séparation négative des lymphocytes T CD4+**

Les anticorps marqués et spécifiques aux molécules CD45 exprimées sur les autres types cellulaires composant l'échantillon de PBMC s'y attacheront. Un complexe tétramérique d'anticorps pourra reconnaître cet anticorps et s'y lier tout en s'attachant aux particules magnétiques de la solution. Cette solution placée dans l'aimant permettra de retenir les billes magnétiques, et les cellules à éliminer, permettant ainsi de recueillir le reste de la solution contenant les lymphocytes T CD4+.

### 1.3 Données de méthylation

#### 1.3.1 Séquençage (MCC-seq)

L'ADN des lymphocytes T CD4+ a d'abord été obtenu grâce au *DNeasy Blood and Tissue kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) selon le protocole du manufacturier. Ce protocole comprend d'abord une lyse des cellules et de leur noyau afin de libérer le matériel génétique qui y est contenu. Par la suite, l'échantillon lysé est passé dans une colonne qui permet de retenir l'ADN et de le purifier en enlevant les débris cellulaires par lavage avec divers tampons. Finalement, l'ADN est élué par un dernier tampon puis précipité avec de l'isopropanol et lavé une dernière fois par de l'éthanol à 70%.

La technique utilisée pour obtenir le niveau de méthylation des CpG d'intérêts distribués sur tout le génome est le *methyI-capture sequencing* (mcc-seq). Cette technique a été mise au point par l'équipe du Dr Tomi Pastinen, les collaborateurs du présent projet, en collaboration avec la branche recherche et développement de Roche Nimblegen (Roche NimbleGen, Madison, WI, É.-U.). Brièvement, cette technique de séquençage de nouvelle génération permet de séquencer des régions d'intérêts de l'ADN en les capturant. Par conséquent, il est possible de mesurer le niveau de méthylation des CpG qui s'y trouvent. Cette étape a été effectuée en collaboration avec l'équipe du Dr Tomi Pastinen à la plateforme du Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.

La première étape est la préparation de la librairie pour le séquençage pour chacun des échantillons. Cette étape a été faite avec le *KAPA High Throughput Library Preparation Kit* (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, É.-U.). La quantité d'ADN utilisée variait de 700 à 1000ng selon la quantité de départ. De l'ADN non méthylé  $\lambda$  (concentration de 0.01%) (Promega, Madison, WI, É.-U.) y est ajouté et sert de substrat pour les enzymes de restriction de la réaction. Cet ADN de départ avait aussi préalablement été fragmenté en morceaux de 300 à 400 paires de bases (pb) par sonication. La taille des fragments a été validée par le *Bioanalyzer* d'Agilent (Agilent, Santa Clara, CA, É.-U.) qui utilise un procédé automatisé d'électrophorèse. Une fois le matériel de départ prêt, la librairie a ensuite pu être appliquée aux échantillons selon le protocole fourni par le manufacturier. Le procédé comprend une étape de réparation des extrémités des fragments d'ADN. Ceci permet par la suite aux adaptateurs spécifiques de s'hybrider sur les fragments pour l'étape subséquente de capture des fragments et de séquençage. Par la suite, la librairie a été convertie au bisulfite de sodium afin de pouvoir procéder au séquençage des sites de méthylation ciblés. Cette conversion au bisulfite de sodium a été faite grâce au *Epitect Fast DNA Bisulfite Kit* (Qiagen) selon le protocole du manufacturier. Brièvement, ce procédé permet de conserver les cytosines méthylées et de changer en uraciles celles qui ne le sont pas. Les lectures faites lors du séquençage subséquent permettront donc de mesurer le niveau de méthylation en prenant en compte le signal des cytosines restantes. Par la suite, la quantification de la quantité d'ADN pour chaque échantillon a été mesurée par fluorescence avec *oliGreen* (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Une amplification par PCR a ensuite été faite avec le *Kapa Hifi Uracil+DNA polymerase* (KAPA Biosystem) avec 9 à 12 cycles PCR selon la quantité d'ADN mesurée, dans le but d'avoir une quantité suffisante de matériel pour la réaction de séquençage. Finalement, une purification des librairies amplifiée a aussi été faite pour éliminer les produits PCR non désirés.

L'étape de capture des fragments a été faite par le *SeqCap Epi Enrichment System protocol* (Roche NimbleGen) selon le protocole du fabricant. Cette capture repose sur des sondes s'hybridant sur les deux brins de l'ADN de la région ciblée lors d'une incubation avec celles-ci. Dans ce cas-ci, la capture a été faite à une température de 40°C pendant 72h. Une réaction de capture peut être faite pour 12 échantillons simultanément. Comme la quantité d'ADN nécessaire pour une capture est de 1ug, 84ng de chaque échantillon étaient mis en commun pour chaque capture. Toujours selon le protocole du manufacturier, la librairie capturée a été encore une fois amplifiée et purifiée avant de pouvoir procéder au séquençage des fragments capturés. Ce séquençage a été fait sur la plateforme *HiSeq4000* (Illumina, San Diego, CA, É.-U.) en utilisant une configuration permettant de séquencer les fragments à partir des deux extrémités, 3' et 5' (paired-end), et de générer des séquences d'une longueur de 100pb. Les régions ciblées, soit 822 884, comportaient un total de 4 609 564 CpG et ont généré 119 089 296pb séquencées.

### 1.3.2 Alignement et contrôles qualité

Une fois les régions d'intérêts séquencées, il est nécessaire de situer celles-ci sur le génome afin de connaître les positions des CpG dont la méthylation différentielle a été mesurée. Cette étape, l'alignement, a été faite grâce à *GenAP\_pipe pipeline 425* (<https://bitbucket.org/muggic/genpipes>) un outil d'analyse étape par étape développé par le Centre d'Innovation Génome Québec de l'Université McGill. La version hg19/GRCh37 du génome humain a été utilisée comme génome de référence.

Dans un premier temps, les séquences brutes doivent être triées selon l'indice de score phred. Celui-ci est un indicatif de la fiabilité et l'efficacité du séquençage [159]. Les séquences dont le score phred est de 30 et plus et dont la longueur en paire de bases est de 50 et plus ont été conservées. Les adaptateurs Illumina spécifiques à la réaction de séquençage ont été retirés des séquences grâce à l'outil *Trimmomatic* (v.0.36) [160]. En effet, une réaction de séquençage nécessite l'ajout de courtes séquences aux fragments d'ADN lors de la préparation de la librairie. Ceux-ci doivent donc être retirés afin d'obtenir les séquences d'ADN réelles. L'alignement à proprement parler a ensuite été fait en utilisant l'outil *Bismark* (v.0.18.2) et *bowtie2* (v.2.3.1) développé par une équipe de l'Université du Maryland [161, 162]. Les séquences présentant en duplicata ont aussi été retirées grâce à l'outil *picard* (v.2.9.0).

Finalement, les CpG se retrouvant à la même position que des SNP (selon la liste de référence dbSNP 137) ont été exclus, tous comme ceux pour lesquels il y avait moins de 5 séquences et ceux se retrouvant dans la *DAC Blacklisted 32 Regions* ou la *Duke Excluded Regions* [163]. Ce dernier critère permet de retirer les CpG se retrouvant dans des régions problématiques du génome, souvent caractérisées par des répétitions de nucléotides [163]. Les CpG pour lesquels des données étaient disponibles pour moins de 120 échantillons ont aussi été enlevés pour les analyses subséquentes. Les données de méthylation ont été rendues disponibles pour 173 échantillons. En effet, seulement ceux ayant des résultats pour au moins 1,5 million de CpG ont été conservés.

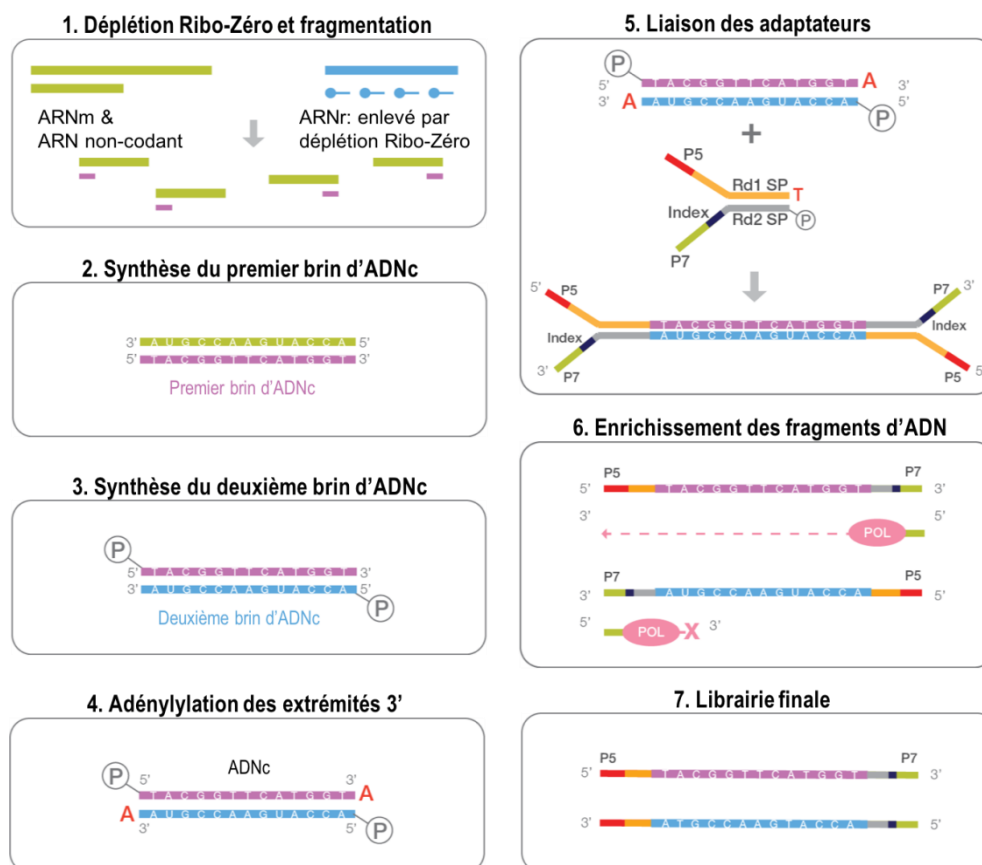
## 1.4 Données d'expression

### 1.4.1 Séquençage de l'ARN

Une quantité précise de cellules ( $2 \times 10^6$ ) a été préalablement congelée à  $-80^\circ\text{C}$  dans une solution de TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ce réactif permet de conserver adéquatement les acides nucléiques, en particulier l'ARN qui est beaucoup moins stable que l'ADN lors de la congélation à basse température ( $-80^\circ\text{C}$ ). Ce réactif permet donc l'obtention d'un l'ARN ayant une intégrité, une pureté ainsi qu'une concentration adéquate [164]. L'isolation de l'ARN total (ARNt) a été faite grâce au *RNeasy Mini Kit* selon le protocole du manufacturier (Qiagen). Il s'agit d'une méthode permettant la lyse des cellules puis la purification de la solution obtenue sur colonne grâce à différents tampons dont l'affinité avec l'ARN est variable. La filtration sur colonne de la solution avec les lavages permet d'éliminer les débris cellulaires avant d'éluer l'ARN purifié à la fin du processus. Le dosage de l'ARN a ensuite été fait sur le *Bioanalyzer* d'Agilent afin d'obtenir la concentration ainsi que la mesure d'intégrité (RIN) des échantillons. Le RIN devait être d'autre moins 7 pour considérer que l'échantillon était valable et adéquat pour les étapes subséquentes. Les échantillons ont ensuite été envoyés à l'équipe du Dr Tomi Pastinen à l'Université McGill, collaborateur du présent projet, afin de procéder à la mesure de l'expression des gènes à la plateforme Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.

Le niveau d'expression des gènes a été mesuré par séquençage, tout comme pour la méthylation. Dans un premier temps, une quantité de 500ng d'ARNt pour chaque échantillon a été utilisée pour préparer la librairie de séquençage. Celle-ci a été faite grâce au *TruSeq Stranded Total*

RNA Sample Preparation Kit d'Illumina selon le protocole du manufacturier. La figure suivante illustre les grandes étapes du processus de préparation de la librairie (Figure 9).



**Figure 9. Processus de création de la librairie pour le séquençage de l'ARN.**

La figure représente les étapes de la création de la librairie utilisée pour le séquençage des ARN pour la mesure de l'expression. L'ARN est d'abord épuré pour ne conserver que l'ARNm et les ARN non codants et fragmenté (1) en portions plus courtes. Par la suite, la synthèse du premier brin d'ADNc peut être amorcée (2) avant de procéder à la synthèse du deuxième brin d'ADNc, complémentaire au premier et dont les thymines sont modifiées en uracile (3). La modification des brins d'ADNc synthétisés par l'adénylylation des extrémités 3' et la liaison des adaptateurs (4-5) permettra par la suite d'enrichir les fragments d'ADNc par PCR (6). Cet enrichissement ne se fera que sur le premier brin d'ADNc qui sera conservé et fera partie de la librairie finale (7) (modifiée du *TruSeq Stranded Total RNA Reference Guide* (Illumina, San Diego, CA, É.-U.)).

Les échantillons d'ARN sont d'abord épurés pour enlever les ARN ribosomaux (ARNr). Ceci s'effectue grâce à des billes se liant aux ARNr et les retenant lors d'une séparation magnétique. Les échantillons d'ARN sont ensuite fragmentés avant de procéder à la transcription inverse et de synthétiser le premier brin d'ADNc de la réaction à l'aide d'une polymérase. L'étape suivante consiste à synthétiser un autre brin d'ADNc à partir du premier synthétisé et dont les thymines (T) sont remplacées par des uraciles (U). Ce remplacement permettra d'éliminer cet ADNc de la librairie par la



suite. En effet, ce deuxième brin d'ADNc remplace l'ARN de base et permet de l'éliminer de la librairie. Par la suite, deux modifications sont appliquées aux brins d'ADNc. D'abord, ceux-ci subiront une adénylylation de leur extrémité 3' (ajout d'une adénine (A)). L'ajout de ce nucléotide A empêche les brins d'ADNc de se lier entre eux et de créer des produits chimériques lors de la prochaine modification. Cette deuxième modification permet de lier les adaptateurs de séquençage aux brins d'ADNc. Ces adaptateurs se lieront aux deux extrémités de chaque brin d'ADNc. Finalement, les brins d'ADNc modifiés et prêts à être séquencés sont amplifiés par PCR afin d'obtenir une quantité suffisante de matériel génétique pour le séquençage. La polymérase utilisée à cette étape ne permet pas d'incorporer des nucléotides U à la séquence créée. Par conséquent, le deuxième brin d'ADNc synthétisé précédemment n'est pas amplifié et peut être épuré de la librairie finale.

Les librairies ont ensuite été dosées afin de connaître leur concentration finale grâce au *Bioanalyzer* d'Agilent. Elles ont finalement été soumises à la plateforme *HiSeq2000* d'Illumina en utilisant une configuration permettant de séquencer les fragments à partir des deux extrémités, 3' et 5' (paired-end), et de générer des séquences d'une longueur de 100pb.

#### **1.4.2 Alignement et contrôles qualité**

Comme pour les données de séquençage générées pour la technique de mcc-seq, le score phred a été utilisé comme premier filtre ( $\text{phred}33 \geq 30$ ) tout comme la longueur des lectures faites qui devaient être d'au moins 32 paires de bases pour être conservées. L'outil *Trimmomatic* (v.0.32) a été utilisé pour retirer les séquences des adaptateurs Illumina ayant permis le séquençage des fragments d'ADNc [160]. Les séquences ont finalement pu être alignées sur la version hg19/GRCh37 du génome humain en utilisant les outils *TopHat* (v.2.0.10), développé à l'université Johns Hopkins, et *bowtie2* (v.2.1.0) [162, 165]. Il a ensuite été possible d'extraire le nombre de comptes de chacun des gènes séquencés avec l'outil *htseq-count* (v.0.6.1) [166].

Une normalisation du compte de chacun des gènes a été faite. Ceci permet de ramener les valeurs selon la taille totale de la librairie (nombre de comptes total). Ceci a été possible grâce à l'outil *DeSeq2* sur l'environnement R [167]. Une fois les données normalisées, un dernier tri a été fait avant de pouvoir procéder aux analyses. Les gènes ayant moins de 10 lectures pour tous les échantillons étaient considérés comme non exprimés par les cellules. Par conséquent, ceux-ci ont été exclus des

analyses. Les données de séquençage ont donc pu être obtenues pour 173 échantillons et ont par conséquent servi aux étapes subséquentes.

## 1.5 Données génétiques

Les données génétiques utilisées dans la présente étude étaient disponibles pour 1 214 individus faisant partie de la cohorte familiale d'asthme du SLSJ. Ces données ont été générées à partir d'échantillons de sang complet prélevés lors du recrutement initial des participants à la fin des années 1990. L'ADN génomique (ADNg) de ces échantillons sanguins a été extrait avec le *Blood and Cell Culture Midi kit* de Qiagen et vérifié pour le contrôle de la qualité des échantillons (pureté et concentration). Le génotypage a ensuite été fait pour chaque échantillon grâce à la puce *Illumina 610K Quad array*. L'utilisation de cette puce a permis le génotypage simultané de plus de 582 000 SNP dans chaque échantillon. Comme ces données ont été obtenues il y a plusieurs années, celles-ci ont ensuite été imputées afin d'inclure les nouvelles variations du génome répertoriées après la fabrication de cette puce. Cette imputation permet d'inférer statistiquement les haplotypes de chaque échantillon à des positions non couvertes par la puce d'origine en se basant sur des bases de données répertoriant les variations du génome connues à ce jour [168]. Ceci a permis de considérer un nombre encore plus élevé de SNP répartis sur tout le génome pour un total d'environ 7 millions. Le logiciel *SHAPEIT2* a d'abord été utilisé pour la phase d'estimation des haplotypes des données génétiques [169]. La phase d'imputation a ensuite été performée grâce au logiciel *IMPUTE2* en utilisant les banques de données du *1000 Genomes Project* et du *UK10K Project* comme informations de références pour l'imputation [170]. Les données génétiques imputées ont ensuite été filtrées selon certains critères de qualité : 1) taux de génotypage  $\geq 95\%$ ; 2) *individual call rate*  $\geq 95\%$ ; 3) fréquence de l'allèle mineur  $\geq 0,01$ ; 4) valeur p de l'équilibre d'Hardy-Weinberg  $\geq 0,0001$ .

## 1.6 Analyses

### 1.6.1 Méthylation

Les associations entre le niveau de méthylation des CpG et les phénotypes ont été calculées en utilisant un modèle linéaire généralisé pour les phénotypes d'asthme et d'asthme allergique. Il s'agit d'un type d'approche permettant de considérer des données non numériques, comme les pourcentages de méthylation dans ce cas-ci [171]. Ce modèle a pu être appliqué dans l'environnement R. Les covariables incluses dans ce modèle sont l'âge lors du prélèvement sanguin, le sexe, le statut

tabagique (fumeurs/ex-fumeur et non-fumeurs), des variables substituts (SV, ou *surrogate variables*) et la proportion des cellules CD4+. Les SV sont des variables importantes à prendre en compte dans l'analyse de la grande quantité de données générées par les technologies à haut débit. En effet, le calcul de ces variables permet de prendre en compte dans le modèle l'effet de l'hétérogénéité technique de l'expérimentation et de lui attribuer une valeur. Ainsi, combinées aux autres co-variables, les SV pourront permettre d'obtenir un modèle fidèle et des données corrigées plus représentatives de la réalité. Ces SV ont été calculés dans l'environnement R en utilisant l'outil sva [172]. La proportion des cellules CD4+ a quant à elle été calculée afin de prendre en compte la pureté de chaque échantillon et de pouvoir ainsi l'intégrer au modèle. Pour se faire, une méthode développée par Houseman sur l'outil *RnBeads* dans l'environnement R a été utilisée [173]. Cette méthode permet de comparer la méthylation d'un certain nombre de CpG à des données de méthylation références provenant de bases de données. Pour le calcul de la proportion des CD4+, des données provenant de 10 types différents de cellules ont été utilisées (CD4+, CD8+, CD14+, CD19+, éosinophiles, granulocytes, neutrophiles, PBMC et un mélange de globules blancs).

Les valeurs  $p$  ( $p$ -value) générées ont ensuite été ajustées pour le *false discovery rate* (FDR). Cet ajustement est nécessaire pour les analyses comprenant des comparaisons multiples, comme dans le cas présent. Celle-ci permet d'avoir un  $p$ -value prenant en compte la probabilité d'obtenir des erreurs de type I, c'est-à-dire des associations faussement significatives (faux positifs) [174]. Par la suite, les valeurs de différence de méthylation ( $\Delta$ -meth) pour chaque site CpG significatif retenu ( $FDR \leq 0,05$ ) ont ensuite été calculées en soustrayant la moyenne du pourcentage de méthylation des participants témoins (sans asthme ou sans asthme allergique) à la moyenne du pourcentage de méthylation des participants atteints du phénotype (asthme ou asthme allergique). Afin de classer les CpG selon leur localisation chromosomique, leurs positions ont été comparées aux positions chromosomiques de l'ensemble des gènes contenus dans l'ADN humain, et ce pour les CpG dont le  $FDR \leq 0,05$  et le  $\Delta$ -meth  $\geq 5\%$ . Il a ainsi été possible d'identifier la localisation des CpG soit 1) à l'intérieur d'un gène, 2) intergénique ou 3) dans le promoteur d'un gène (défini comme la région de 1000 pb en amont du TSS).

Finalement, les coefficients de corrélation entre les sites CpG ont également été calculés afin d'identifier lesquels pouvaient être considérés ensemble dans l'interprétation des résultats. Pour se

faire, des corrélations de Kendall ont été faites sur les données de méthylation. Les comparaisons faites pour les paires de CpG en position Cis, soit à  $\pm 5000$  pb l'un de l'autre, et en position trans, soit à  $\pm 250\,000$  pb l'un de l'autre. Les *p-value* ont également été corrigés pour les comparaisons multiples (FDR).

### 1.6.2 Expression

Afin de déceler les différences entre le niveau d'expression chez les individus atteints et témoins pour les deux phénotypes à l'étude (asthme et asthme allergique), un modèle binomial négatif a été utilisé sur les données d'expression normalisées. Ce modèle permet de prendre en compte la distribution étendue des données. Les covariables incluses dans ce modèle sont l'âge lors du prélèvement sanguin, le sexe, le statut tabagique (fumeurs/ex-fumeur et non-fumeurs), les SV calculées ainsi que la proportion des cellules CD4+. Les SV ainsi que la proportion des cellules CD4+ ont été calculées de la même façon que pour les données de méthylation. Les *p-value* générés ont été ajustées par la méthode de FDR, tel qu'expliqué précédemment. Les différences d'expression entre les groupes, témoins (sans asthme) et atteints (asthme ou asthme allergique), étaient considérées significatives pour  $FDR \leq 0,05$ .

### 1.6.3 Corrélations méthylation – expression

Afin d'investiguer le lien pouvant exister entre les données de méthylation et d'expression, une analyse de régression binomiale négative a été faite. Encore une fois, les covariables utilisées étaient l'âge lors du prélèvement sanguin, le sexe, le statut tabagique (fumeurs/ex-fumeurs et non-fumeurs), les SV calculées ainsi que la proportion des cellules CD4+. Une correction pour comparaison multiple par FDR a également été appliquée aux *p-value* générés et considérées comme significative pour  $FDR \leq 0,05$ . L'analyse de corrélation a été faite uniquement pour les CpG significativement différemment méthylés ainsi que pour les gènes différemment exprimés ( $FDR \leq 0,05$ ) et ce pour les deux phénotypes à l'étude.

#### 1.6.4 eQTL

Les analyses eQTL, de l'anglais *expression quantitative trait loci*, ont été menées à partir des données d'expression obtenues des échantillons de lymphocytes CD4+ purifiés et des données génétiques obtenues à partir de sang complet. Ce type d'analyse combine donc deux types de données et permet d'identifier quels SNP ont une influence sur l'expression d'un gène en particulier. Les combinaisons SNP – gène exprimé ont été évaluées pour des sites éloignés à moins de 1Mb l'un de l'autre (cis-eQTL). Les eQTL ont été calculées à partir de l'outil *Matrix eQTL* sur l'environnement R [175]. Une correction statistique pour comparaison multiple a également été appliquée pour obtenir les eQTL significatifs ( $FDR \leq 0,05$ ). Finalement, les résultats ont été triés afin de trouver les eQTL ayant comme cible les gènes différemment exprimés pour les deux phénotypes à l'étude (asthme et asthme allergique).

## CHAPITRE 2 – RÉSULTATS

Le processus de recrutement entamé pour ce projet a permis d'obtenir un échantillon de 215 participants pour lesquels le prélèvement sanguin et l'isolation des cellules T CD4+ ont été faits. Les différents protocoles ont permis de générer des résultats pour 173 échantillons suite aux différents contrôles de qualité décrits dans le chapitre précédent. Le Tableau 2 ci-dessous regroupe les informations phénotypiques relatives aux participants de l'étude.

**Tableau 2. Caractéristiques phénotypiques des individus recrutés dans la présente étude**

	Asthmatiques (n=107)	Témoins (n=66)	Tous (n=173)
Ratio M:F	1:1.1	1:1	1:1.06
Âge, moyenne (écart-type) <sup>a</sup>	45 (17)	55 (14)	49 (16)
Âge, médiane (intervalle)	44 (18-79)	59 (24-81)	52 (18-81)
Statut tabagique <sup>b</sup>			
Non-fumeur (%)	68 (64)	30 (46)	98 (57)
Ex-fumeur (%)	20 (19)	21 (32)	41 (24)
Fumeur (%)	18 (17)	14 (21)	32 (19)
IMC, moyenne (écart-type) <sup>c</sup>	23,2 (9,4)	23,9 (7,8)	23,7 (8,8)
CP <sub>20</sub> , moyenne (écart-type) <sup>d</sup>	2,6 (12,9)	28,6 (25,2)	6,6 (23,9)
VEMS <sub>1</sub> , moyenne en % préd, (écart-type) <sup>e</sup>	90,0 (25,3)	103,1 (23,6)	95,1 (25,6)
CVF, moyenne en % préd, (écart-type) <sup>f</sup>	99,7 (37,6)	106,0 (27,1)	102,2 (34,7)
Ratio VEMS <sub>1</sub> /CVF, moyenne (écart-type) <sup>g</sup>	76 (28,2)	81,5 (18,4)	78,2 (25,6)
Niveau IgE sérique, moyenne (écart-type) <sup>h</sup>	136,5 (5,7)	44,2 (4,9)	86,8 (5,9)
Asthme, n (%)	107 (100)	0 (0)	107 (61,8)
Âge de début, moyenne (intervalle) <sup>i</sup>	13 (0-54)	NA	13 (0-54)
Allergie, n (%) <sup>j</sup>	80 (74,8)	28 (42,4)	108 (62,4)
Avec asthme, n (%)	80 (74,8)	0 (0)	80 (46)

<sup>a</sup>Moyenne et médiane de l'âge pour 203 individus. <sup>b</sup>Ex-fumeur définis par un arrêt tabagique de un an ou plus. <sup>c</sup>Moyenne de l'indice de masse corporelle (IMC) avec écart type. <sup>d</sup>Moyenne géométrique de la concentration de métacholine provoquant une chute de 20% du volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS<sub>1</sub>). <sup>e</sup>Moyenne du VEMS<sub>1</sub> calculée en % de la valeur prédite avec écart-type. <sup>f</sup>Moyenne de la capacité vitale forcée (CVF) calculée en % de la valeur prédite avec écart-type. <sup>g</sup>Moyenne du ratio FEV<sub>1</sub> (L)/FVC (L) calculé en % avec écart-type. <sup>h</sup>Moyenne géométrique du niveau d'IgE sérique avec écart-type. <sup>i</sup>Moyenne de l'âge de début de l'asthme. <sup>j</sup>Statut d'allergie défini par au moins une réponse positive dans le test d'allergie à la piqûre (défini comme un diamètre d'induration de 3mm ou plus après 10 minutes).

Il y a 107 individus qui sont asthmatiques et les 66 personnes non asthmatiques forment le groupe témoin. Pour ce qui est de l'asthme allergique, le nombre d'individus atteints des deux conditions est de 80 personnes comparées à 38 témoins qui sont sans asthme ni allergie.

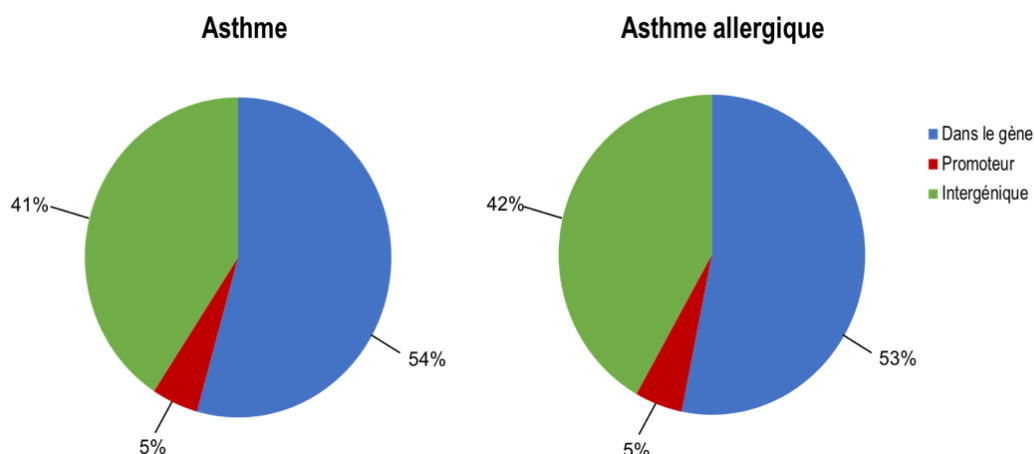
## 2.1 Niveau différentiel de méthylation

L'analyse par modèle linéaire généralisé a permis d'identifier une grande quantité de CpG différenciellement méthylé et statistiquement significatifs. Le Tableau 3 ci-dessous dresse un résumé du nombre de CpG identifié selon différentes conditions.

**Tableau 3. Nombre de CpG différemment méthylés en présence d'asthme ou d'asthme allergique**

Phénotype	CpG significatifs (FDR ≤ 0,05)	CpG significatifs (FDR ≤ 0,05) Δ-meth ≥ 5%	CpG significatifs (FDR ≤ 0,05) Δ-meth ≥ 10%
Asthme	23 501	2 146	90
Asthme allergique	21 865	3 756	399

Le tri a donc permis d'identifier 2 146 et 3 756 CpG d'intérêts pour le phénotype d'asthme et d'asthme allergique respectivement. En effet, la valeur seuil pour considérer une différence de méthylation ( $\Delta$ -meth) au niveau d'un CpG a été fixée à 5%. Ceci est une décision arbitraire dans le but de limiter le nombre de résultats pour les analyses différentielles subséquentes. Il a ensuite été possible de classer ceux-ci selon leur position chromosomique tel que présenté à la Figure 10 suivante.



**Figure 10. Distribution des sites CpG différemment méthylés**

Cette figure illustre la répartition des sites CpG différemment méthylés (FDR ≤ 0.05) et dont la différence de méthylation est égale ou plus grande que 5%. La portion bleue correspond aux CpG situés dans les gènes (introns et exons), la portion verte à ceux situés dans des régions intergéniques et la portion rouge aux CpG situés dans les régions promotrices (définies comme la région de 1000 paires de bases en amont du TSS).

Les deux distributions des CpG par phénotype sont semblables. Plus de la moitié des CpG se retrouvent dans des gènes (introns et exons confondus) alors qu'une faible portion de ceux-ci, soit 5%, sont situés dans les régions promotrices des gènes pour les deux phénotypes analysés (235 et 380 sites CpG respectivement pour l'asthme et l'asthme allergique).

Les deux sous-sections suivantes traiteront plus en profondeur des résultats de méthylation selon le phénotype analysé; asthme d'abord puis asthme allergique.

### 2.1.1 Asthme

Le Tableau 4 regroupe les 10 meilleures associations pour le phénotype d'asthme retenu suite au tri fait pour la valeur de FDR et la  $\Delta$ -meth. Une analyse de corrélation a été faite entre les CpG pour déterminer quels CpG étaient corrélés significativement entre eux. Ainsi, il est possible de voir le meilleur CpG associé dans le tableau ainsi que le nombre de CpG avec lesquels celui-ci est corrélé. Seulement les corrélations avec un  $FDR \leq 0,05$  et une valeur de force de corrélation ( $\tau$ )  $\geq 0,5$  ont été considérées dans cette table. Cette valeur de  $\tau$  a été choisie puisque dans la littérature, elle correspond à une force de corrélation moyenne [176]. Les valeurs de force des corrélations sont aussi indiquées sous forme d'intervalle tout comme celles du  $\Delta$ -meth, du  $p$ -value et du  $p$ -value corrigé (FDR) pour les CpG étant corrélés avec d'autres.

Il est possible de remarquer que la plupart des CpG se situent dans des régions intergéniques, particulièrement dans des sites de *DNase I hypersensitivity cluster* et des îlots CpG, avec des  $\Delta$ -meth variant entre -15,49% et 16,07% ( $FDR$  8,32E-07- 4,46E-02). Trois des meilleures associations se situent quant à elles au sein d'îlots CpG localisés dans les régions codantes des gènes *OBSCN* (*obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF*) et *CDH1* (*cadherin 1*) ( $\Delta$ -meth : -14,54 – 14,54;  $FDR$  : 9,17E-09 - 4,55E-02).

Le Tableau 5 regroupe quant à lui les données relatives aux 10 meilleurs CpG associés à l'asthme et se retrouvant dans les régions promotrices des gènes. De ceux-ci, seulement trois étaient corrélés avec au moins un autre site CpG ( $p$ -value  $\leq 0,05$  et  $\tau \geq 0,5$ ). Comme mentionné



précédemment, les régions promotrices ont été définies comme étant la séquence de 1000pb en amont du TSS d'un gène. Les différences de méthylation observées sont moins élevées que pour les 10 meilleures associations sans regard à la position du CpG dans le génome ( $\Delta$ -meth : 5,05% – 11,45%). L'annexe I renferme le tableau contenant toutes les associations significatives de CpG au niveau des promoteurs des gènes.

**Tableau 4. Meilleures différences de méthylation entre les individus asthmatiques et témoins**

Meilleur CpG	Nbr*	Chr**	Position (range)	Gène***	tau Kendall (intervalle)	$\Delta$ -meth**** (intervalle)	<i>p</i> -value (intervalle)	FDR***** (intervalle)
5.0_106599583	4	5	106 599 492 – 106 599 583	Intergénique (DNase I hypersensitivity cluster)	0,68 – 0,81	10,60 – 16,07	5,49E-07 – 1,45E-03	8,13E-06 – 2,06E-02
6.0_33587826	1	6	33 587 826	Intergénique (DNase I hypersensitivity cluster)	NA	-15,49	2,61E-03	3,62E-02
12.0_8599320	1	12	8 599 320	Intergénique	NA	14,99	3,03E-03	4,17E-02
5.0_158103826	4	5	158 103 810 – 158 103 998	Intergénique (DNase I hypersensitivity cluster)	0,53 – 0,66	8,92 – 14,72	5,61E-08 – 2,61E-03	8,32E-07 – 3,62E-02
19.0_12666377	1	19	12 666 377	Intergénique (DNase I hypersensitivity cluster, îlot CpG)	NA	14,67	2,95E-03	4,07E-02
1.0_228401950	10	1	228 401 926 – 228 402 036	Exon 3 <i>OBSCN</i> (îlot CpG)	0,53 – 0,65	8,25 – 14,54	3,21E-06 – 3,32E-03	4,75E-05 – 4,55E-02
3.0_46139305	1	3	46 139 305	Intergénique (DNase I hypersensitivity cluster)	NA	-14,54	1,83E-03	2,58E-02
15.0_21995784	3	15	21 995 784 – 21 995 805	Intergénique (îlot CpG)	0,53 – 0,61	7,23 – 13,93	7,75E-04 – 3,25E-03	1,12E-02 – 4,46E-02
16.0_68772225	1	16	68 772 225	Exon 2 <i>CDH1</i> (îlot CpG)	NA	-13,70	9,18E-05	1,35E-03
1.0_228464273	11	1	228 464 171 – 228 464 337	Exon 22 <i>OBSCN</i> (îlot CpG)	0,54 – 0,73	-7,00 – -13,44	6,18E-10 – 2,00E-03	9,17E-09 – 2,80E-02

\*Nbr : nombre de CpG corrélé au meilleur CpG identifié; \*\*Chr : chromosome; \*\*\*Gène : Pour le nom complet des gènes, la liste des abréviations en page vii; \*\*\*\* $\Delta$ -meth : différence de méthylation (en %); \*\*\*\*\*FDR : *false discovery rate*

**Tableau 5. Meilleures différences de méthylation pour les CpG situés dans des promoteurs entre les individus asthmatiques et les témoins**

Meilleur CpG	Nbr*	Chr**	Position (intervalle)	Gène***	tau Kendall (intervalle)	$\Delta$ -meth**** (intervalle)	p-value (intervalle)	FDR (range)*****
7.0_151138528	4	7	151 137 882 – 151 138 548	<i>CRYGN</i>	0,62-0,70	9,58 - 12,95	1,45E-11 -2,17E-07	2,53E-13 – 3,19E-06
16.0_21830837	1	16	21 830 837	<i>RRN3P1</i>	NA	-11,45	2,06E-03	2,89E-02
7.0_72993657	1	7	72 993 657	<i>TBL2</i>	NA	11,35	1,12E-03	,1 60E-02
22.0_25843113	2	22	25 843 113 – 25 816 368	<i>CRYBB2P1</i>	-0,13	-10,40 - 5,05	4,06E-11 – 1,09E-05	6,02E-10 – 1,62E-04
9.0_35860175	1	9	35 860 175	<i>LINC00950</i>	NA	10,05	2,62E-03	3,64E-02
8.0_91659078	1	8	91 659 078	<i>TMEM64</i>	NA	-9,90	3,00E-03	4,14E-02
20.0_62178897	1	20	62 178 897	<i>SRMS</i>	NA	9,41	3,21E-03	4,41E-02
17.0_5674573	15	17	5 674 571 – 5 674 659	<i>LOC339166</i>	0,72 – 0,83	-8,05 – -9,34	1,08E-07 – 2,73E-03	1,61E-06 – 1,40E-02
11.0_17499197	1	11	17 499 197	<i>ABCC8</i>	NA	-9,30	7,83E-05	1,15E-03
6.0_167276543	1	6	167 276 543	<i>RPS6KA2</i>	NA	-9,23	1,35E-04	1,98E-03

\*Nbr : nombre de CpG corrélé au meilleur CpG identifié; \*\*Chr : chromosome; \*\*\*Gène : Pour le nom complet des gènes, la liste des abréviations en page vii; \*\*\*\* $\Delta$ -meth : différence de méthylation (en %); \*\*\*\*\*FDR : *false discovery rate*

### 2.1.2 Asthme allergique

Tout comme pour le phénotype d'asthme, un tableau a été fait afin de regrouper les informations relatives aux meilleures associations concernant la méthylation (Tableau 6). Comme pour le Tableau 4, le Tableau 6 renferme les informations pour chacun des CpG ainsi que pour ceux avec lesquels ils sont corrélés selon les mêmes critères utilisés pour le phénotype d'asthme ( $FDR \leq 0,05$ ;  $\tau \geq 0,5$ ). Les valeurs de force des corrélations sont indiquées en intervalle tout comme celles du  $\Delta$ -meth, du  $p$ -value et du  $p$ -value corrigé (FDR) pour les CpG étant corrélés avec d'autres.

La majorité des sites CpG identifiés se retrouvent dans les régions intergéniques et plus particulièrement sur des zones de *DNase I hypersensitivity cluster* avec des niveaux de méthylation variant de -20,37 à 19,27% ( $FDR : 5,22E-10 - 3,30E-02$ ). Contrairement aux CpG identifiés pour le phénotype asthme, aucun de ceux-ci ne se retrouve au niveau d'îlot CpG. De plus, seulement 3 des meilleurs CpG identifiés sont corrélés significativement avec d'autres CpG ( $\tau = 0,56 - 0,77$ ). Un seul CpG se retrouve dans un gène, soit dans l'intron 22 de *CNTNAP2* (*contactin associated protein like 2*) (CpG 7.0\_148095252). Finalement, un des meilleur CpG du tableau 6 se retrouve dans une région promotrice, soit à 14pb en amont de *GUSBP1* (*GUSB pseudogene 1*) ( $\Delta$ -meth=9,24 – 16,76;  $FDR=7,43E-05 - 1,18E-02$ ). Un autre se retrouve très près de la région promotrice de *HLA-DQB1* (*major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1*), à 1196pb en amont du gène.

Le Tableau 7 renferme les résultats relatifs aux meilleurs CpG associés à l'asthme allergique et se retrouvant dans les régions promotrices des gènes, selon les critères définis précédemment (1000pb en amont du TSS). Les 10 CpG représentés dans le tableau sont indépendants, c'est-à-dire qu'ils ne sont corrélés avec aucun autre CpG avec des valeurs de  $\Delta$ -meth variant de -16,18% à 15,89% ( $FDR= 3,93E-06 - 4,59E-02$ ). L'annexe II renferme le tableau contenant toutes les associations significatives de CpG au niveau des promoteurs des gènes.

**Tableau 6. Meilleures différences de méthylation entre les individus asthmatiques allergiques et les témoins**

Meilleur CpG	Nbr*	Chr**	Position (intervalle)	Gène***	tau Kendal (intervalle)	Δ-meth**** (intervalle)	p-value meth (intervalle)	FDR***** (intervalle)
7.0_148095252	3	7	148 095 318 – 148 096 270	Intron 22 <i>CNTNAP2</i> (DNase I hypersensitivity cluster)	0,56 – 0,77	-21,41 – -11,54	4,36E-16 – 8,58E-04	6,57E-15 – 1,25E-02
8.0_7924357	1	8	7 924 357	Intergénique	NA	-20,37	4,19E-10	6,31E-09
16.0_2911353	1	16	2 911 353	Intergénique (DNase I hypersensitivity cluster)	NA	19,27	2,22E-04	3,29E-03
11.0_115376310	1	11	115 376 310	1069bp downstream <i>CADM1</i> (Dnase I hypersensitivity cluster)	NA	-18,87	9,74E-05	1,45E-03
19.0_3174026	1	19	3 174 026	Intergénique	NA	18,34	3,47E-11	5,22E-10
6.0_32635662	1	6	32 635 662	1196pb en amont de <i>HLA- DQB1</i>	NA	17,70	3,99E-09	6,00E-08
3.0_46139305	1	3	46 139 305	Intergénique (DNase I hypersensitivity cluster)	NA	-17,48	6,01E-04	8,82E-03
18.0_64390049	2	18	64 390 049 – 64 390 065	Intergénique (DNase I hypersensitivity cluster)	0.67	-17,04 – -13,37	4,93E-09 – 2,33E-08	7,42E-08 – 3,51E-07
5.0_21341928	7	5	21 341 908 – 21 341 959	14pb en amont de <i>GUSBP1</i>	0,61 – 0,73	9,24 – 16,76	4,95E-06 – 8,07E-04	7,43E-05 – 1,18E-02
13.0_90014376	1	13	90 014 376	Intergénique (DNase I hypersensitivity cluster)	NA	-16,60	2,33E-03	3,30E-02

\*Nbr : nombre de CpG corrélé au meilleur CpG identifié; \*\*Chr : chromosome; \*\*\*Gène : Pour le nom complet des gènes, la liste des abréviations en page vii; \*\*\*\*Δ-meth : différence de méthylation (en %); \*\*\*\*\*FDR : *false discovery rate*

**Tableau 7. Meilleures différences de méthylation pour les CpG situés dans des promoteurs entre les individus asthmatiques et les témoins**

Meilleur CpG	Nbr*	Chr**	Position (intervalle)	Gène***	tau Kendall (intervalle)	$\Delta$ -meth**** (intervalle)	p-value meth (intervalle)	FDR***** intervalle)
22.0_25843113	1	22	25 843 113	<i>CRYBB2P1</i>	NA	-16,18	2,61E-07	3,93E-06
9.0_95857577	1	9	95 857 577	<i>CARD19</i>	NA	15,89	8,86E-04	1,29E-02
15.0_91427363	1	15	91 427 363	<i>FES</i>	NA	-15	3,29E-03	4,59E-02
7.0_72993657	1	7	72 993 657	<i>TBL2</i>	NA	13,94	1,02E-04	1,52E-03
21.0_15353133	1	21	15 353 133	<i>ANKRD20A11P</i>	NA	-13,93	1,88E-04	2,80E-03
20.0_31593239	1	20	31 593 239	<i>SUN5</i>	NA	13,85	6,93E-04	1,02E-02
21.0_15353304	1	21	15 353 304	<i>ANKRD20A11P</i>	NA	-13,28	2,27E-05	3,40E-04
14.0_103989865	1	14	103 989 865	<i>CKB</i>	NA	-12,97	1,81E-04	2,69E-03
6.0_94130034	1	6	94 130 034	<i>EPHA7</i>	NA	-12,65	1,45E-03	2,09E-02
21.0_47012613	1	21	47 012 613	<i>LINC01694</i>	NA	-12,37	7,88E-04	1,15E-02

\*Nbr : nombre de CpG corrélé au meilleur CpG identifié; \*\*Chr : chromosome; \*\*\*Gène : Pour le nom complet des gènes, la liste des abréviations en page vii; \*\*\*\* $\Delta$ -meth : différence de méthylation (en %); \*\*\*\*\*FDR : *false discovery rate*

## 2.2 Niveau différentiel d'expression

### 2.2.1 Asthme

L'étude de l'expression différentielle des gènes dans les cellules des personnes asthmatiques, comparativement aux cellules de témoins, a permis de mettre en évidence 57 gènes différemment exprimés après correction statistique pour comparaison multiple ( $FDR \leq 0,05$ ). Les résultats relatifs à ces gènes se retrouvent dans le Tableau 8 suivant.

**Tableau 8. Gènes différentiellement exprimés entre les individus asthmatiques et témoins**

<b>Gène*</b>	<b>ET**</b>	<b>p-value</b>	<b>FDR***</b>	<b>Foldchange</b>
<i>ABCC3</i>	0,009	1,12E-05	4,62E-03	1,22
<i>APOBEC3B</i>	0,207	7,83E-05	2,34E-02	0,65
<i>ARMC3</i>	0,022	1,50E-09	8,98E-07	1,39
<i>ATF6B</i>	0,033	9,33E-09	5,32E-06	0,88
<i>AVPR1A</i>	0,028	4,33E-08	2,36E-05	1,75
<i>CDC20</i>	0,143	9,50E-05	2,64E-02	0,61
<i>CDC6</i>	0,109	8,98E-05	2,56E-02	0,80
<i>CLEC1B</i>	0,013	6,60E-55	1,58E-51	1,27
<i>CSNK2B</i>	0,034	2,15E-20	2,57E-17	0,83
<i>CXCL5</i>	0,010	4,50E-135	2,69E-131	1,75
<i>EGF</i>	0,010	8,74E-12	6,70E-09	1,57
<i>FBXL19-AS1</i>	0,058	1,56E-04	3,74E-02	0,85
<i>FZD7</i>	0,097	5,43E-05	1,81E-02	0,67
<i>GATA2</i>	0,146	8,20E-05	2,39E-02	0,69
<i>GNG11</i>	0,005	3,53E-26	5,28E-23	1,58
<i>GP1BA</i>	0,016	4,74E-15	4,36E-12	1,33
<i>GP9</i>	0,010	1,73E-25	2,30E-22	1,38
<i>GPBAR1</i>	0,098	9,92E-05	2,64E-02	0,89
<i>GSTM1</i>	0,022	2,06E-40	4,11E-37	1,26
<i>HIST1H3C</i>	0,089	1,63E-04	3,81E-02	0,75
<i>HIST1H3F</i>	0,110	2,45E-05	9,16E-03	0,94
<i>HIST1H3G</i>	0,159	4,78E-06	2,38E-03	0,72
<i>HLX</i>	0,185	1,72E-04	3,96E-02	0,74
<i>HSPA2</i>	0,159	7,50E-06	3,32E-03	0,42
<i>KIF13A</i>	0,105	7,46E-05	2,34E-02	1,00
<i>LATS2</i>	0,093	8,28E-06	3,54E-03	0,92
<i>LOC391322</i>	0,026	2,28E-10	1,44E-07	1,10
<i>LOH12CR2</i>	0,130	2,19E-04	4,76E-02	0,64
<i>MARC1</i>	0,233	1,22E-05	4,87E-03	1,10
<i>MKI67</i>	0,140	7,79E-05	2,34E-02	0,89

MORC1	0,025	5,44E-11	3,62E-08	1,61
MYL9	0,010	5,94E-57	1,78E-53	1,63
NT5DC2	0,127	6,94E-05	2,24E-02	0,56
PARN	0,012	4,43E-05	1,51E-02	1,04
PDGFRA	0,034	1,56E-04	3,74E-02	1,45
PHTF1	0,064	3,23E-05	1,14E-02	0,99
PLXND1	0,103	5,16E-06	2,47E-03	0,84
PPBP	0,002	1,01E-18	1,10E-15	1,51
PPP1R26	0,101	9,88E-05	2,64E-02	0,78
QPRT	0,070	2,29E-04	4,89E-02	0,82
RASGRP4	0,146	1,17E-04	2,99E-02	0,90
SCN3A	0,134	2,09E-04	4,62E-02	0,68
SEC14L5	0,018	8,19E-59	3,27E-55	1,91
SEMA3G	0,131	2,53E-05	9,17E-03	0,65
SH3TC2	0,016	2,68E-11	1,89E-08	1,60
SLC2A5	0,131	1,14E-04	2,96E-02	0,66
SNORD116-21	0,018	1,44E-05	5,56E-03	1,04
SPOCD1	0,023	1,86E-18	1,85E-15	1,78
TMEM40	0,013	1,75E-04	3,96E-02	1,42
TUBB	0,024	8,96E-12	6,70E-09	0,85
TUBB1	0,002	7,75E-248	9,27E-244	1,59
UBAC2-AS1	0,058	1,24E-04	3,10E-02	0,86
VAR2	0,049	4,08E-27	6,98E-24	1,51
VEPH1	0,019	1,12E-06	5,83E-04	1,53
VTRNA1-3	0,162	5,43E-06	2,50E-03	0,48
ZFPM2	0,048	4,62E-13	3,95E-10	1,62

\*Pour le nom complet des gènes, voir la liste des abréviations en page vii; \*\*ET: erreur type ; \*\*\*FDR : *False discovery rate*

Il est possible de remarquer que 34 gènes sont moins exprimés dans les cellules des individus asthmatiques comparativement aux cellules de témoins (*Foldchange* : 0,42 - 0,99; FDR : 2,57E-19 - 4,89E-02) alors que 22 sont plus exprimés dans les cellules des individus asthmatiques (*Foldchange* : 1,04 - 1,91; FDR : 9,27E-244 – 3,96E-02).

## 2.2.2 Asthme allergique

Le Tableau 9 suivant présente les informations relatives aux gènes différemment exprimés dans les cellules T CD4+ des individus asthmatiques allergiques. L'analyse a permis de mettre en évidence 33 gènes différemment exprimés dans les cellules T CD4+ des personnes asthmatiques allergiques comparativement aux témoins.



**Tableau 9. Gènes différentiellement exprimés entre les individus asthmatiques allergiques et témoins**

Gène*	ET**	p-value	FDR***	Foldchange
AGPAT1	0,064	1,56E-05	6,68E-03	1,59
ARMC3	0,030	1,30E-52	1,11E-49	1,59
AVPR1A	0,037	2,65E-87	4,54E-84	2,44
C15orf54	0,017	1,91E-307	2,29E-303	2,22
CACNA2D3	0,047	1,41E-07	6,26E-05	1,11
CLEC10A	0,021	6,99E-82	1,05E-78	1,21
CMTM5	0,020	1,14E-53	1,05E-50	1,74
EGF	0,014	9,86E-176	3,94E-172	1,91
FAM160B1	0,035	5,50E-05	2,20E-02	0,94
GNG11	0,007	2,95E-246	1,77E-242	1,75
GP1BA	0,021	9,83E-20	6,21E-17	1,62
GP9	0,014	7,27E-95	1,74E-91	1,75
GRB14	0,040	6,92E-29	4,89E-26	2,01
IL17RB	0,199	9,24E-05	3,57E-02	0,48
KCNA5	0,069	7,83E-13	4,09E-10	1,11
KIRREL3	0,050	1,97E-11	9,84E-09	1,19
LIPH	0,044	2,13E-09	1,02E-06	1,74
LOC100287036	0,036	8,26E-26	5,51E-23	1,58
MORC1	0,035	3,33E-16	2,00E-13	1,80
MS4A4A	0,067	6,67E-14	3,81E-11	1,45
NAT8B	0,036	5,50E-13	3,00E-10	1,73
P2RY12	0,015	1,56E-93	3,12E-90	1,78
PDGFRA	0,046	1,49E-38	1,12E-35	1,70
PRDM8	0,061	2,86E-05	1,18E-02	0,81
PRH1-PRR4	0,044	1,15E-04	4,33E-02	1,09
PTCRA	0,017	1,14E-72	1,51E-69	1,51
RGS7	0,073	1,29E-04	4,68E-02	1,22
SLFN14	0,023	2,02E-42	1,62E-39	1,71
STEAP4	0,057	1,58E-59	1,72E-56	1,62
TMEM40	0,018	1,01E-55	1,01E-52	1,71
TREML1	0,013	1,48E-163	4,45E-160	1,99
VEGFC	0,082	9,87E-09	4,55E-06	2,02
VEPH1	0,027	2,17E-65	2,61E-62	1,79

\*Pour le nom complet des gènes, voir la liste des abréviations en page vii; \*\*ET : erreur type ; \*\*\*FDR : *False discovery rate*

Presque tous les gènes présentés dans ce tableau sont plus exprimés dans les cellules des individus asthmatiques allergiques versus les témoins (30 gènes/33 totaux). Ces gènes sont de 1,09

à 2,44 fois plus exprimés chez les échantillons provenant d'asthmatiques allergiques avec une valeur de FDR variant de 2,29E-303 à 4,68E-02.

En comparant les gènes des tableaux 8 et 9, il est possible de remarquer que 10 gènes sont différemment exprimés en commun pour les deux phénotypes étudiés soit : *ARMC3* (*armadillo repeat containing 3*), *AVPR1A* (*arginine vasopressin receptor 1A*), *EGF* (*epidermal growth factor*), *GNG11* (*G protein subunit gamma 11*), *GP1BA* (*glycoprotein Ib platelet subunit alpha*), *GP9* (*glycoprotein IX platelet*), *MORC1* (*MORC family CW-type zinc finger 1*), *PDGFRA* (*platelet derived growth factor receptor alpha*), *TMEM40* (*transmembrane protein 40*) et *VEPH1* (*ventricular zone expressed PH domain containing 1*). Ces gènes sont également tous plus exprimés dans les cellules des cas comparativement aux témoins et ce peu importe le phénotype (*foldchange*  $\geq 1,38$ ).

## 2.3 Corrélations méthylation- expression

L'analyse des corrélations entre les données de méthylation et d'expression a été faite grâce à un modèle de régression binomiale négative. En considérant seulement les données significatives pour la méthylation et l'expression, peu de corrélations entre ces données se sont avérées significatives. Elles sont représentées dans le tableau 10 ci-dessous.

**Tableau 10. Corrélations significatives entre la méthylation et le niveau d'expression**

Phénotype	Type de corrélation	Position CpG	Gène différemment exprimé*	p-value	tau Kendall	FDR**
Asthme	Cis	chr3:129 297 053 ( <i>PLXND1</i> intron)	<i>PLXND1</i>	6,00E-04	-0,29	1,11E-02
		chr6:32 057 846 ( <i>TNXB</i> intron)	<i>ATF6B</i>	6,60E-05	-0,33	2,44E-03
		chr19:38 877 316 ( <i>GGN</i> exon)	<i>RASGRP4</i>	1,44E-03	-0,29	1,78E-02
	Trans	chr22:39 635 774 ( <i>PDGFB</i> intron)	<i>APOBEC3B</i>	2,74E-05	0,36	2,44E-03
Asthme allergique	Cis	chr11:60 010 228 (intergenic)	<i>MS4A4A</i>	7,16E-04	-0,29	1,50E-02

\*Gène différemment exprimé : Pour le nom complet des gènes, voir la liste des abréviations en page vii; \*\*FDR : false discovery rate

Pour le phénotype d'asthme, 4 corrélations se sont avérées significatives ( $FDR \leq 0,05$ ), dont 3 en position *cis* et une seule en position *trans*. Pour l'asthme allergique, une seule corrélation pour un CpG en position *cis* du gène *MS4A4A* (*membrane spanning 4-domains A4A*) s'est avérée significative. Les valeurs de tau montrent toutefois des corrélations de force faible puisqu'elles sont toutes en dessous de 0,05 (-0,33 – 0,36). Presque toutes ces corrélations sont négatives, montrant que le CpG corrélé au gène semble diminuer son expression lorsque sa méthylation augmente. Ces CpG sont presque tous situés à l'intérieur de gènes et devraient avoir l'effet contraire selon la littérature. Par contre, comme ces corrélations sont de forces faibles, ces résultats ne seront pas discutés plus en profondeur.

## 2.4 eQTL

Au total, 6 017 425 eQTL ont été générés, dont 2 253 étaient significatifs ( $FDR \leq 0,049$ ). Le Tableau 11 suivant regroupe les informations relatives aux eQTL identifiés lorsque seulement ceux concernant les gènes différemment exprimés dans les cellules CD4+ sont retenus.

**Tableau 11. eQTL significatifs pour les gènes différemment exprimés**

Phénotype	SNP	Position (hg19)	Gène*	Statistique	p-value eQTL	FDR** eQTL
Asthme	rs144054184	43 562 620	<i>CDC20</i>	6,67	7,64E-10	1,94E-04
	rs149553751	38 122 099	<i>CDC6</i>	5,66	9,74E-08	7,48E-03
	rs140845799	64 908 508	<i>HSPA2</i>	5,21	7,80E-07	3,22E-02
	rs183013937	65 034 083	<i>HSPA2</i>	5,21	7,80E-07	3,22E-02
	rs140659646	65 115 119	<i>HSPA2</i>	5,21	7,80E-07	3,22E-02
	rs143379936	64 562 350	<i>HSPA2</i>	5,22	7,29E-07	3,09E-02
	rs142535348	64 132 769	<i>HSPA2</i>	5,72	7,39E-08	6,18E-03
	rs137917358	64 485 846	<i>HSPA2</i>	5,72	7,39E-08	6,18E-03
	rs145672018	64 599 647	<i>HSPA2</i>	5,90	3,30E-08	3,49E-03
	rs72726297	65 385 437	<i>HSPA2</i>	5,93	2,79E-08	3,05E-03
	rs17375215	12 483 764	<i>LOH12CR2</i>	5,05	1,53E-06	4,89E-02
	rs35954228	12 487 007	<i>LOH12CR2</i>	5,05	1,53E-06	4,89E-02
	rs117625753	12 494 873	<i>LOH12CR2</i>	5,05	1,53E-06	4,89E-02
	rs3741799	12 494 873	<i>LOH12CR2</i>	5,05	1,53E-06	4,89E-02
	rs78204607	12 497 163	<i>LOH12CR2</i>	5,05	1,53E-06	4,89E-02
	rs79140529	12 481 150	<i>LOH12CR2</i>	5,21	7,49E-07	3,12E-02
	rs112862548	12 481 528	<i>LOH12CR2</i>	5,21	7,49E-07	3,12E-02
	rs111747493	12 481 870	<i>LOH12CR2</i>	5,21	7,49E-07	3,12E-02

	rs77401656	12 480 293	LOH12CR2	5,23	7,11E-07	3,02E-02
	rs79967075	12 480 305	LOH12CR2	5,23	7,11E-07	3,02E-02
	rs73277447	12 477 477	LOH12CR2	5,25	6,51E-07	2,86E-02
	rs112322346	12 478 339	LOH12CR2	5,25	6,51E-07	2,86E-02
	rs544309343	12 478 416- 12 478 430	LOH12CR2	5,25	6,51E-07	2,86E-02
	rs11054814	12 480 360	LOH12CR2	5,26	6,21E-07	2,76E-02
		12 479 537	LOH12CR2	5,28	5,68E-07	2,60E-02
	rs11054813	12 480 088	LOH12CR2	5,28	5,68E-07	2,60E-02
	rs11054810	12 476 947	LOH12CR2	5,30	5,19E-07	2,40E-02
	rs73277439	12 475 215	LOH12CR2	5,31	4,82E-07	2,28E-02
	rs73277441	12 475 294	LOH12CR2	5,31	4,82E-07	2,28E-02
	rs73277443	12 475 373	LOH12CR2	5,31	4,82E-07	2,28E-02
	rs79058507	12 475 417	LOH12CR2	5,31	4,82E-07	2,28E-02
		12 475 498	LOH12CR2	5,31	4,82E-07	2,28E-02
	rs201752590	12 475 506	LOH12CR2	5,31	4,82E-07	2,28E-02
	rs145082849	12 476 139	LOH12CR2	5,31	4,82E-07	2,28E-02
	rs146418129	12 476 161	LOH12CR2	5,31	4,82E-07	2,28E-02
	rs61271342	12 476 401	LOH12CR2	5,31	4,82E-07	2,28E-02
	rs57217767	12 476 402	LOH12CR2	5,31	4,82E-07	2,28E-02
	rs58042333	12 476 444	LOH12CR2	5,31	4,82E-07	2,28E-02
	rs11054812	12 480 049	LOH12CR2	5,32	4,72E-07	2,26E-02
	rs73277446	12 477 016	LOH12CR2	5,36	3,98E-07	1,97E-02
	rs60871036	12 476 686	LOH12CR2	5,37	3,79E-07	1,90E-02
	rs57468925	12 476 694	LOH12CR2	5,37	3,79E-07	1,90E-02
	rs113707879	12 474 789	LOH12CR2	5,45	2,58E-07	1,51E-02
	rs149137081	12 474 890	LOH12CR2	5,45	2,58E-07	1,51E-02
	rs73277438	12 475 021	LOH12CR2	5,45	2,58E-07	1,51E-02
	rs80076564	12 475 050	LOH12CR2	5,45	2,58E-07	1,51E-02
	rs17309991	12 514 864	LOH12CR2	5,80	5,21E-08	4,63E-03
	rs188316475	13 076 627	LOH12CR2	5,86	3,83E-08	3,76E-03
	rs183746611	156 713 511	VEPH1	-6,27	5,49E-09	8,86E-04
	rs17628276	158 172 947	VEPH1	-6,28	5,28E-09	8,58E-04
	rs1155444	105 985 323	ZFPM2	5,12	1,16E-06	4,27E-02
Asthme	rs183746611	156 713 511	VEPH1	-6,27	5,49E-09	8,86E-04
allergique	rs17628276	158 172 947	VEPH1	-6,28	5,28E-09	8,58E-04

\*Gène: Pour le nom complet des gènes, voir la liste des abréviations en page vii; \*\*FDR : false discovery rate

Ainsi, 51 eQTL ont été identifiés pour 6 gènes différents pour le phénotype asthme : *CDC20* (*cell division cycle 20*), *CDC6* (*cell division cycle 6*), *HSPA2* (*heat shock protein family A (Hsp70) member 2*), *LOH12CR2* (*loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 2*), *VEPH1* et *ZFPM2* (*zinc*

*finger protein, FOG family member 2*). Seulement 2 eQTL ont été retenus pour un seul gène différemment exprimé, *VEPH1*, pour le phénotype asthme allergique. Ces deux eQTL sont également présents pour le phénotype asthme (pour les rs183746611 et rs17628276).

## CHAPITRE 3– DISCUSSION

Ce projet de recherche avait pour but de documenter la méthylation ainsi que le niveau d'expression des lymphocytes T CD4+, des cellules immunitaires impliquées dans le processus inflammatoire de l'asthme. Les analyses ont permis de générer des résultats pour l'asthme et l'asthme allergique. Les objectifs ont été atteints puisqu'un patron de méthylation et d'expression pour ces deux phénotypes dans les lymphocytes T CD4+ isolées de patients et de témoins a été documenté.

Dans un premier temps, la technique de mcc-seq a été utilisée afin de générer l'information concernant les sites CpG différemment méthylés dans les cellules d'asthmatiques et d'asthmatiques allergiques comparativement à des témoins sans asthme. La localisation des CpG significatifs permet de constater que peu d'entre eux se retrouvent dans les régions promotrices des gènes, soit 5% seulement pour l'asthme et l'asthme allergique (Figure 10). La méthylation de l'ADN est principalement étudiée dans les régions promotrices puisqu'il est connu que celles-ci renferment des sites de fixation pour différents facteurs de transcriptions qui ont comme rôle d'initier le processus de la transcription [177]. Une modification dans la disponibilité de ces sites peut donc mener à une quantité d'expression d'un gène modifiée et contribuer ou non à certains processus pathophysiologiques [177]. Il a été démontré également que la méthylation dans le corps du gène pouvait mener à une quantité d'expression plus élevée, le contraire de l'effet observé au niveau du promoteur [178]. Une étude sur le cancer a notamment démontré que la méthylation du corps du gène pourrait être une thérapie potentielle en utilisant un inhibiteur de la méthylation dans le corps du gène, menant à une réactivation de gènes inhibés par la méthylation, mais aussi à une diminution de sa surexpression [179]. Comme les mécanismes d'action de la méthylation dans le corps des gènes sont encore peu documentés à l'échelle du génome, le choix pour l'analyse des résultats obtenus par les analyses différentielles de la méthylation a été de se concentrer plus spécifiquement sur les CpG associés aux phénotypes étudiés dans les promoteurs. Le choix a aussi été fait de considérer les différences de méthylation d'au moins 5%.

### 3.1 Différences de méthylation dans l'asthme

Les meilleurs CpG associés à l'asthme au niveau des promoteurs ont mis en évidence 7 gènes codant pour : *CRYGN* (*crystallin gamma N*), *TBL2* (*transducine bêta like 2*), *SRMS* (*src-related kinase lacking C-terminal regulatory tyrosine and N-terminal myristylation sites*), *TMEM64* (*transmembrane protein 64*), *ABCC8* (*ATP binding cassette subfamily C member 8*) et *RPS6KA2* (*ribosomal protein S6 kinase A2*). De ceux-ci, seulement *CRYGN* n'est pas exprimé dans le poumon. Ceci peut être facilement expliqué par le fait que ce gène code pour une protéine cristalline de l'œil. Même si les autres gènes mis en évidence sont exprimés dans le poumon, aucun de ceux-ci n'a déjà été associé à l'asthme ou à une autre maladie respiratoire selon le *BioProject* [180].

Toutefois, *RPS6KA2* est un gène impliqué dans la croissance et la différenciation cellulaire et activé par une voie de signalisation dépendante du facteur de croissance épidermique (EGF) [181]. Or, il est connu que EGF, une molécule retrouvée au niveau de l'épithélium bronchique, agit sur le remodelage des voies respiratoires et l'inflammation au niveau du poumon dans l'asthme [182, 183]. L'implication de *RPS6KA2* dans l'asthme à ce niveau demeure toutefois inconnue. L'expression d'*EGF* est augmentée dans le tissu pulmonaire des adultes et des enfants asthmatiques [184, 185]. Ceci a également été observé dans la présente étude puisque le gène *EGF* est plus exprimé dans les cellules T CD4<sup>+</sup> des participants asthmatiques et asthmatiques allergiques (Tableaux 8 et 9, respectivement : fold change =1,75, FDR=6.70E-02; fold change=1.91, 3.94E-172). Une plus grande quantité d'EGF, liée à une plus grande expression du gène codant, pourrait donc mener à une activation augmentée de *RPS6KA2*. Cette cascade d'activation pourrait influencer la survie et la prolifération de certaines cellules impliquées dans l'inflammation relative à l'asthme. La diminution de la méthylation au niveau d'un CpG ( $\Delta$ -meth -9,23%) du promoteur de *RPS6KA2* pourrait donc stimuler cette activation, à plus forte raison puisque ce CpG se retrouve au sein d'un site de fixation du facteur de transcription USF1 (*upstream transcription factor 1*).

Un autre gène dont la méthylation différentielle a été identifiée est *AXL* (*AXL receptor tyrosine kinase*) (annexe I), impliqué dans la médiation de l'inflammation par son action inhibant certaines cytokines pro-inflammatoires induites par les récepteurs *Toll-like* (TLR), notamment par l'activation du suppresseur de signal des cytokines (SOCS) [186]. Les résultats obtenus dans cette étude sont appuyés par des résultats démontrant qu'une augmentation de la méthylation de CpG au niveau du

promoteur d'*AXL* était associé à un risque accru d'asthme pédiatrique [187]. Les présents résultats pourraient donc démontrer l'implication de la méthylation au niveau de ce gène dans l'asthme. La voie de la régulation de l'inflammation par *AXL* pourrait donc être modifiée dans l'asthme dans cet échantillon en contribuant à la hausse de l'inflammation.

Un autre gène dont la méthylation est diminuée d'un peu plus de 7% dans les CD4+ d'individus asthmatiques au niveau du promoteur est le gène *ATF6* (*activating transcription factor 6*) (annexe I). Ce gène est d'un intérêt particulier puisque celui-ci est activé par *ORMDL3*, un gène situé dans la région génétique 17q12-21 qui est le locus le plus associé à l'asthme à ce jour [92, 95]. En effet, *ORMDL3* est reconnu pour activer le facteur de transcription activateur 6 (*ATF6*) qui à son tour, active le gène *SERCA2b*, associé au remodelage des voies respiratoires dans l'asthme [188]. La méthylation moindre au niveau du promoteur d'*ATF6* pourrait donc permettre une plus grande activation de celui-ci par *ORMDL3* et ultimement une plus grande activation de *SERCA2b*. Aucune différence d'expression au niveau de ces deux gènes ne peut venir appuyer l'implication de cette voie au niveau des cellules T CD4+ dans l'asthme dans cette étude. Toutefois, une expression différentielle d'*ATF6* bêta (*ATF6B*), dont la protéine résultante est retrouvée en dimère avec *ATF6* (aussi connu sous le nom d'*ATF6* alpha), a été observée.

### 3.1.2 Implications de la famille de chemokine CXC dans l'asthme

La méthylation du promoteur d'*ACKR3* (*atypical chemokine receptor 3*), codant pour le récepteur de chemokine atypique 3, s'est avérée être moindre dans les cellules d'individus asthmatiques (-5,08%) et d'asthmatiques allergiques (-6,10%) (Annexe I et II). La chemokine CXCL12 est son ligand et est notamment impliquée dans l'hyperneutrophilie et la néo-vascularisation dans l'asthme, en plus d'être impliquée dans la survie des lymphocytes T CD4+ [189, 190]. Toutefois, aucune information sur l'implication de son récepteur *ACKR3* dans l'asthme ou une autre maladie respiratoire n'a été démontrée. Par ailleurs, un autre gène de la même famille de chemokines, soit *CXCL5* (*C-X-C motif chemokine ligand 5*), s'est avéré être 1,75 fois plus exprimé dans l'échantillon de la cohorte SLSJ étudiée (tableau 8). Son expression a déjà été démontrée comme augmentée chez la souris suite à une augmentation d'IL-17A qui engendre de l'inflammation et une hyperréactivité bronchique [191]. Les chemokines de cette famille pourraient donc constituer des cibles à explorer plus en profondeur avec des études fonctionnelles subséquentes. L'implication de *CXCL5* dans l'asthme



est largement documentée, mais il manque encore de l'information quant au récepteur de CXCL12, *ACKR3*. Aucune différence quant à l'expression de ce gène n'a été observée dans la présente étude.

La différence d'expression de *PPBP* (*pro-platelet basic protein*), codant pour la protéine CXCL7, un autre membre de la famille des chemokines CXC, renforce le rôle de celles-ci dans l'asthme. En effet, l'expression de *PPBP* est environ une fois et demie plus élevée chez les asthmatiques que les témoins (Annexe I). Il est spéculé que cette protéine induirait une activation des neutrophiles dans la maladie pulmonaire obstructive chronique [192]. Or, une étude de Rohde *et al.* a plutôt démontré une diminution de son expression dans un modèle d'asthme induit par un rhinovirus [193]. L'implication de cette protéine dans l'asthme semble donc incertaine. Toutefois, il est possible d'avancer que la divergence entre les résultats de la présente étude et la littérature s'explique par la différence de tissus étudiés, respectivement des cellules T CD4+ et des BAL [193]. L'implication des neutrophiles dans l'asthme et la maladie pulmonaire obstructive chronique peut expliquer la ressemblance des résultats dans les deux pathologies [194]. Une plus grande expression de *PPBP* pourrait donc mener à un recrutement accru des neutrophiles, contribuant à l'inflammation et au remodelage des voies respiratoires dans l'asthme [30].

### 3.2 Différences de méthylation dans l'asthme allergique

Pour ce qui est des meilleurs CpG au niveau des promoteurs associés à l'asthme allergique, ceux-ci se retrouvaient au niveau des promoteurs des 6 gènes suivants : *CARD19* (*caspase recruitment domain family member 19*), *FES* (*FES proto-oncogène, tyrosine kinase*), *TBL2* (*transducin beta like 2*), *SUN5* (*Sad1 and UNC84 domain containing 5*), *CKB* (*creatine kinase B*), *EPHA7* (*EPH receptor A7*). Bien que *CARD19*, *FES*, *TBL2*, *CKB* et *EPHA7* soient des gènes exprimés dans les poumons, aucun de ceux-ci n'a déjà été répertorié comme étant associé à l'asthme ou à l'allergie ou à ces phénotypes combinés. *CARD19*, aussi appelé *BinCARD*, pourrait être d'un certain intérêt puisque ce gène est connu pour réguler le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [195]. En effet, la protéine produite par ce gène aurait un effet inhibiteur sur Bcl10, une protéine essentielle pour l'activation de la voie NF- $\kappa$ B au sein des lymphocytes T et B [196]. À cet effet, NF- $\kappa$ B a déjà été démontré comme étant présent en quantité plus élevée dans les expectorations d'individus asthmatiques [197]. Il est aussi connu que cette voie de signalisation est impliquée dans le processus inflammatoire dans l'asthme puisqu'elle régule certains médiateurs de l'inflammation (cytokines et chemokines) en réponse à l'IL-

1 $\beta$ , au TNF $\alpha$  ou aux récepteurs TLR [198]. Au niveau de médiateurs spécifiques des lymphocytes T CD4+, NF- $\kappa$ B réglera l'expression de gènes associés aux Th1 (dont eotaxine-1, IFN $\gamma$  et IL-2) et aux Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) [199]. Le CpG identifié au niveau du promoteur de *CARD19* pourrait donc influencer son potentiel inhibiteur de la protéine Bcl10 si le niveau d'expression de ce gène est modifié par la méthylation. Ainsi, si cette protéine est présente en quantité moindre, elle pourrait diminuer l'activation de NF- $\kappa$ B. Dans le cas présent, aucune différence au niveau de l'expression du gène *CARD19* n'a été observée pour les deux phénotypes étudiés au niveau des cellules T CD4+. Celui-ci reste néanmoins un gène qui pourrait potentiellement avoir un impact dans l'asthme et la manifestation de l'inflammation par sa régulation de la voie NF- $\kappa$ B.

### **3.2.1 Implications de la voie de l'IL-17 et de l'IL-25 dans l'asthme allergique**

Un CpG au niveau du promoteur du gène codant pour le récepteur de type A de l'IL-17 (*IL17RA*) a été mis en évidence comme étant plus méthylé dans les cellules d'asthmatiques allergiques que dans celles des témoins ( $\Delta$ -meth= 5,10%) (Annexe II). Un autre gène codant pour un récepteur de l'IL-17, cette fois le type B (*IL17RB*), est moins exprimé (près de la moitié moins) dans les cellules des patients asthmatiques que celles des témoins (tableau 9).

Ces résultats mettent donc en évidence le rôle des récepteurs de l'IL-17 et de l'IL-25 dans l'asthme allergique. L'IL17RA peut se lier avec différents types d'interleukines dont l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-17A/F, et l'IL-25 alors que l'IL17RB, se liera avec l'IL-25. Toutefois, comme démontré dans l'étude de Rickel *et al.*, afin que l'IL-25 puisse activer le reste de sa cascade d'actions, celui-ci doit se lier à l'IL17RB en complexe avec l'IL17RA [200]. L'IL-17 et l'IL-25 sont des cytokines inflammatoires connues dans l'asthme. L'IL-17 a été identifié chez les asthmatiques sévères neutrophiliques puisque cette cytokine stimule l'accumulation des neutrophiles dans le tissu pulmonaire et agit par conséquent sur le remodelage des voies respiratoires [201, 202]. L'IL-25 quant à elle est une cytokine qui agit comme promoteur de la différenciation des lymphocytes T vers la voie Th2 [203, 204]. La méthylation plus grande du promoteur d'*IL17RA* pourrait mener à une moins grande accessibilité aux facteurs de transcription et ainsi diminuer la quantité disponible de ces récepteurs au niveau des lymphocytes T CD4+. Les résultats d'expression n'ont toutefois pas permis de consolider cette hypothèse. Par contre, l'expression diminuée d'*IL17RB* appuie une probable diminution de l'action d'IL-25 au niveau des

cellules T CD4+. Une étude de Hunninghake *et al.* a mis en évidence que le niveau d'expression d'*IL17RB* dans les lymphocytes T CD4+ expliquait 19% de la variance du niveau d'IgE sérique des hommes asthmatiques [205]. Une autre étude menée sur le même type cellulaire a montré un niveau d'expression d'*IL17RB* chez des participants atteints de rhinosinusite chronique avec polypes nasales éosinophiliques [206]. L'expression de ce gène a également été démontrée comme étant plus élevée dans l'asthme, au niveau des fibroblastes pulmonaires et des cellules épithéliales pulmonaires lors d'une réaction allergique au niveau des voies respiratoires [203, 207]. À première vue, les résultats semblent aller à l'encontre de ceux obtenus dans la littérature. Toutefois, il est connu que l'expression des gènes est dépendante du tissu étudié. Il est donc possible qu'au niveau des CD4+ isolées du sang de personnes asthmatiques allergiques, l'expression d'*IL17RB* soit diminuée pour favoriser l'action du récepteur *IL17RA*. Celui-ci peut se lier à une plus grande variété de cytokines et viendrait ainsi contribuer à l'inflammation et à la polarisation des lymphocytes naïfs vers la voie Th2 observée dans l'asthme allergique.

### 3.3 Expression différentielle de gènes impliqués dans l'asthme et l'asthme allergique

Dans tous les gènes différemment exprimés dans les lymphocytes T CD4+ des asthmatiques comparativement aux témoins, 10 sur 57 (17,5%) ont une fonction pertinente dans un contexte d'asthme (tableau 8). De ceux-ci, on compte *EGF*, *ATF6B*, *PPBP* et *CXCL5* dont il est question dans les sections précédentes de la discussion. Les autres sont les gènes codants pour : *APOBEC3B* (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3B*), *GATA2* (*GATA binding protein 2*), *GSTM1* (*glutathione S-transferase mu 1*), *HLX* (*homeobox H2.0 like*), *MKI67* (*marker of proliferation Ki-67*) et *PDGFRA* (*platelet derived growth factor receptor alpha*).

Les gènes *APOBEC3B*, *GSTM1* et *HLX* ont tous trois déjà été identifiés dans l'asthme infantile, que ce soit avec les exacerbations d'asthme ou le risque de développer cette maladie [208-210]. Plus particulièrement, une région différemment méthylée en aval du TSS de *HLX* a été identifiée chez des enfants asthmatiques faisant partie d'un couple de jumeaux discordants pour le statut d'asthme [210]. Les résultats de la présente étude pour ce gène viennent donc renforcer l'implication probable de celui-ci dans l'asthme, même si aucune différence de méthylation n'a été observée. De par sa fonction de régulateur de la différenciation vers la voie Th1 des lymphocytes T, une modification de son expression dans un contexte d'asthme semble logique puisque cette voie de différenciation est influencée par

différents médiateurs dans l'asthme [209]. Pour ce qui est de *GSTM1*, les résultats dans la littérature semblent mitigés. Une première méta-analyse menée sur plus de 4 500 enfants a montré qu'un génotype nul correspondait à un risque accru d'asthme alors qu'une autre étude de 2018 ne montrait aucune association entre ce génotype et le risque d'asthme, même si ce génotype était plus présent chez les enfants asthmatiques [211, 212]. Les résultats obtenus dans la présente étude sur l'expression semblent montrer une implication de ce gène dans l'asthme, mais d'autres études seront nécessaires.

L'expression de *GATA2*, un facteur de transcription, a été démontrée comme légèrement plus élevée chez les individus asthmatiques allergiques comparativement aux témoins [213]. Dans la présente étude, c'est le contraire puisque *GATA2* est moins exprimé dans l'asthme. Une autre étude dans un modèle murin d'asthme induit et traité avec des lipopolysaccharides bactériens a aussi démontré une augmentation de *GATA2*, mais cette fois au niveau des mastocytes [214]. Les résultats de la présente étude semblent en contradiction, mais démontrent tout de même que l'expression *GATA2* est modifiée dans l'asthme. L'utilisation d'une population spécifique de cellules différentes pourrait expliquer cette discordance avec la littérature. Pour ce qui est de *MKI67*, l'expression de ce gène est utilisée comme marqueur de prolifération cellulaire [215]. Le niveau de la protéine encodée par ce gène, ki67, est plus élevé dans l'épithélium bronchique des personnes asthmatiques sévères ce qui suggère une prolifération cellulaire contribuant au remodelage des voies respiratoires [216]. Comme l'échantillon utilisé dans la présente étude comporte peu d'asthmatiques sévères, il est logique que les résultats divergent, en plus du tissu utilisé qui est différent. La protéine ki67 semble donc être en quantité plus faible chez les individus asthmatiques de notre échantillon.

*PDGFRA* est plus exprimé dans les cellules T CD4+ des asthmatiques dans la présente étude, mais également dans les cellules d'asthmatiques allergiques. En tout, 10 gènes sont plus exprimés dans les deux phénotypes étudiés (tableau 8 et 9). Toutefois, mis à part *PDGFA* dont il sera question ci-dessous, et *EGF* déjà discuté précédemment, aucun autre n'a de fonction pouvant se rattacher à l'asthme, l'allergie ou un trait connexe (*ARMC3*, *AVPR1A*, *GNG11*, *GP1BA*, *GP9*, *MORC1*, *TMEM40* et *VEPH1*). *PDGFRA* est un gène impliqué dans la voie de signalisation MAPK. En effet, le complexe de fusion *FIP1L1-PDGFRA* a déjà été associé au syndrome d'hyperréosinophilie et est reconnu comme une molécule impliquée dans la croissance et la survie de cellules hématopoïétiques [217].

L'éosinophile est une cellule importante dans la pathophysiologie de l'asthme et l'implication de cette molécule pourrait contribuer à la présence de ces cellules dans l'asthme.

La majorité des gènes identifiés pour l'asthme allergique sont plus exprimés que pour les témoins (tableau 9). De ceux-ci, on en retrouve peu ayant un lien avec le phénotype étudié : *EGF*, *IL17RB* et *PDGFRA* dont il a été question dans les sections précédentes et *CLEC10A* (*C-type lectin domain containing 10A*). La molécule encodée par ce gène, la *methionine gamma-lyase* (MGL), a été démontré comme impliquée dans la maturation des cellules dendritiques qui agissent comme cellules présentatrices d'antigènes lors d'une première exposition à un allergène [218]. MGL a aussi été démontré comme augmentant l'expression d'IL-10 et de TNF- $\alpha$  dans les cellules dendritiques par l'activation des signaux par les TLR. L'IL-10 agit comme agent répresseur de l'inflammation et est présent en quantité plus faible dans le sérum des asthmatiques où la composante inflammatoire est prépondérante [219]. Ceci semble donc contradictoire avec une expression accrue de *CLEC10A* dans l'asthme allergique observée dans la présente étude puisqu'une plus grande expression devrait mener à une plus grande libération d'IL-10. Toutefois, l'expression de l'IL-10 peut être modifiée par l'action d'autres gènes qui ne sont pas ici identifiés. De plus, l'action des miARN, un autre mécanisme épigénétique, pourrait mener à la dégradation d'une portion de l'ARNm d'IL-10 et limiter son effet dans l'asthme allergique. Toutefois, il ne s'agit que de spéculations qui devraient être vérifiées par des études fonctionnelles approfondies.

### 3.4 Intégration des données

La présente étude a permis de mettre en évidence certaines corrélations significatives entre le niveau de méthylation et le niveau d'expression des gènes pour ceux dont l'expression génique est modifiée, que ce soit dans les cellules T CD4<sup>+</sup> isolées de personnes atteintes d'asthme ou d'asthme allergique. Par contre, ces corrélations sont modestes (Tableau 10). Plusieurs autres mécanismes épigénétiques pourraient influencer le niveau d'expression des gènes et pourraient par conséquent mieux expliquer la modification du niveau d'expression de ceux-ci (miARN ou modifications au niveau des histones). Il est connu qu'une modification du niveau de méthylation peut être corrélée avec le niveau d'expression d'un gène au niveau des régions promotrices [119, 120]. Toutefois, une étude récente a démontré que l'expression d'une petite proportion des gènes pouvait être prédite par la méthylation de l'ADN dans trois populations différentes, dont une sur les PBMC d'individus allergiques

ou avec un asthme persistant [220]. Ceci met encore l'emphasis sur le fait que la méthylation à elle seule n'a pas le pouvoir d'expliquer toutes les différences d'expression. Afin de pouvoir explorer cette relation plus en profondeur, une avenue potentielle serait de considérer les îlots CpG ou encore les régions différemment méthylées (DMR) plutôt que les CpG seuls afin d'expliquer une portion de la variation de l'expression de certains gènes.

Comme l'expression des gènes peut aussi être influencée par certains SNP, des analyses eQTL ont été faites pour les données d'expression et génétiques de l'échantillon étudié, sans égard au phénotype. Par la suite, les eQTL dont l'expression du gène impliqué était modifiée dans l'asthme ou l'asthme allergique ont été conservés pour donner les résultats du tableau 11. Aucun des gènes différemment exprimés dont l'expression est influencée par un SNP n'a déjà été associé à l'asthme ou encore à l'inflammation. L'interprétation de ceux-ci est donc limitée puisque davantage d'investigations seraient nécessaires pour déterminer un rôle potentiel de ces gènes dans l'asthme. Toutefois, l'expression du gène *VEPH1* (*ventricular zone expressed PH domain containing 1*) semble être modulée par deux SNP différents, et ce pour les deux phénotypes étudiés (rs183746611 et rs17628276). Bien que n'ayant jamais été associé à l'asthme ou à un trait lié à l'asthme, *VEPH1* est hautement exprimé dans le poumon et pourrait avoir un rôle dans la pathophysiologie de l'asthme [180].

L'expression d'un gène peut également être influencée par l'accessibilité de la chromatine. La technique d'ATAC-seq ou *Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput Sequencing* permet de caractériser les régions de la chromatine qui sont accessibles [221]. L'accessibilité variable de la chromatine modifie donc l'accessibilité aux sites actifs du génome permettant ainsi l'expression des gènes. Lors de l'isolation des lymphocytes T CD4+ dans le présent projet, une portion des cellules restantes, soit un million, a été traitée pour pouvoir procéder à la mesure de l'accessibilité de la chromatine par ATAC-seq. Toutefois, les résultats ne se sont pas avérés concluants et aucune donnée n'a pu être étudiée. L'ATAC-seq fonctionne mieux avec des échantillons frais. Les échantillons cellulaires utilisés dans le présent projet avaient au préalable été congelés à -80°C pour les conserver plus longtemps. Le cycle gel-dégel suivant a donc pu altérer la qualité des échantillons et mener à la dégradation des nucléosomes. Ceci pourrait donc expliquer l'échec de la méthode dans le présent projet. Une meilleure optimisation de la méthode ainsi que l'utilisation de

nouveaux échantillons cellulaires purifiés et frais permettraient sûrement d'obtenir de meilleurs résultats.

### **3.5 Le défi du séquençage de nouvelle génération**

L'analyse de la méthylation au niveau des promoteurs a permis de mettre en évidence certains gènes différemment méthylés et dont l'implication dans l'asthme ou l'asthme allergique est probable dans la présente étude et d'autres résultats pertinents pourraient être mis en évidence en triant différemment les résultats ou en procédant avec une stratégie d'analyse différente. La grande quantité d'informations générées par le séquençage de nouvelle génération permet cet éventail large de possibilité. En effet, ces technologies, comme celles utilisées dans le présent projet pour mesurer le niveau de méthylation et d'expression, permettent de générer une quantité importante d'information [222]. Seulement pour la méthylation, plus de 3 millions de CpG ont été séquencés dans le présent projet. Pour l'expression des gènes, c'est le profil complet d'expression qui a été mesuré pour chaque échantillon, représentant pas moins de 150 000 transcrits (incluant les gènes codants, les ARN non codants, les ARN variés ainsi que les pseudogènes) selon RefSeq [223].

Certains défis émergent donc de ces avancées technologiques particulièrement concernant l'analyse des données générées. L'obtention des données brutes générées par ces études est sans cesse optimisée par des protocoles plus performants qui évoluent à un rythme plus rapide que les outils informatiques et analytiques utilisés pour comprendre ces résultats [224]. De ce fait, de nouvelles méthodes et stratégies d'analyse émergent sans cesse, permettant de déchiffrer de mieux en mieux les données brutes obtenues par séquençage de nouvelle génération. Dans le cas présent, le choix a été fait de décortiquer les résultats en considérant les CpG pour la méthylation ainsi que leur  $\Delta$ -meth spécifique. Ce portrait a donc permis de cibler certains gènes sur lesquels il serait pertinent d'en apprendre davantage par des études subséquentes, comme par exemple en utilisant une technique de pyroséquençage sur certains CpG d'intérêts aux alentours des CpG associés dans la présente étude. Une autre approche qui aurait pu être utilisée dans ce projet est l'analyse des régions différenciellement méthylées (DMR). Ce type d'analyse permet de dresser un portrait plus global de la méthylation. Une région DMR peut comprendre plusieurs CpG plus ou moins éloignés, dont la méthylation globale moyenne est plus ou moins grande pour le phénotype étudié que pour le groupe contrôle. Ainsi, il est possible d'identifier des DMR spécifiques où la méthylation est différente et

associée à un phénotype. Une analyse plus fine doit ensuite être conduite pour trouver les gènes différemment méthylés ayant un impact réel dans le phénotype.

### **3.6 Limites de l'étude**

L'échantillon utilisé constitue un avantage méthodologique important, mais impose aussi certaines limites. En effet, la population du SLSJ est caractérisée par un triple effet fondateur, correspondant à une population plus homogène génétiquement qu'une population cosmopolitaine [152]. Ainsi, certaines associations génétiques faites dans un contexte d'asthme ou d'asthme allergique peuvent être plus représentatives de cette population que liées aux traits étudiés. La réplication des résultats obtenus dans un autre échantillon pourrait constituer un bon moyen de valider les associations faites, autant au niveau de la méthylation que de l'expression, afin d'évaluer si celles-ci sont généralisables.

Le nombre d'échantillons utilisés dans la présente étude est considérable pour des échantillons cellulaires purifiés. La méthode utilisée dans le présent projet se faisait conjointement avec l'isolation d'un autre type de cellules immunitaires impliquées dans l'asthme et l'allergie, les éosinophiles. Le tout rajoutait des étapes supplémentaires et augmentait considérablement le temps passé en laboratoire pour obtenir les échantillons cellulaires purifiés. De plus, une portion des échantillons a été traitée afin de pouvoir procéder à la méthode d'ATAC-seq, visant à mesurer l'accessibilité de la chromatine du génome des échantillons de cellules T CD4+. Ce protocole ajoutait encore du temps à la manipulation puisque les échantillons devaient être traités immédiatement après leur isolation et avant leur congélation à -80°C. Ainsi, compte tenu de cette contrainte temporelle et ultimement budgétaire, il a été décidé de compléter l'étude lorsque 200 échantillons seraient atteints. Finalement, 215 individus auront été rencontrés pour lesquels les échantillons sanguins ont permis d'isoler les deux types cellulaires d'intérêt.

Une dernière limite à mentionner est la pureté des échantillons de lymphocytes T CD4+ obtenus. Le protocole complet d'isolation des lymphocytes T CD4+ comportait une étape de comptage des cellules à l'hématimètre où il était possible de vérifier à l'œil s'il y avait présence de contamination par d'autres types de cellules comme les granulocytes ou encore les monocytes. À la fin de la



manipulation, lorsque la fraction cellulaire purifiée est obtenue, un décompte cellulaire est effectué grâce à un compteur de cellule automatisé qui compte les cellules selon leur taille. Il est possible que certains autres types de lymphocytes aient pu se retrouver dans l'échantillon, comme les CD8+ par exemple, puisque même lors d'une identification visuelle, il est impossible de faire la distinction entre les sous-types de lymphocytes. Par contre, pour pallier à ceci, la proportion de CD4+ a été calculée dans les analyses et incluse comme covariable dans toutes les analyses subséquentes.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## 1. Conclusion générale

La présente étude a permis de documenter le patron de méthylation et d'expression des lymphocytes T CD4+ dans l'asthme au niveau d'un échantillon de la Cohorte familiale d'asthme du SLSJ. L'obtention de résultats de méthylation par une méthode de séquençage de nouvelle génération a permis d'identifier des CpG différenciellement méthylés au niveau des promoteurs des gènes dans les cellules des asthmatiques et des asthmatiques allergiques comparativement aux témoins. Certaines différences d'expression ont également été identifiées en plus de certaines interactions significatives lorsque les données génétiques ont été intégrées aux données d'expression recueillies (eQTL). En somme, il a été possible d'identifier certains gènes dont l'implication dans l'asthme serait probable sur la base de leurs fonctions biologiques et de leurs rôles dans d'autres conditions ayant une composante inflammatoire. Ceci permet donc d'ouvrir la voie vers des études plus spécifiques de certaines régions géniques d'intérêts des lymphocytes T CD4+ dans un contexte d'asthme.

## 2. Perspectives

Actuellement, une nouvelle évaluation de la condition respiratoire et du statut allergique est en cours pour les participants de la présente étude. Cette nouvelle évaluation, 15 à 20 ans après la fondation de la Cohorte d'asthme du SLSJ, permettra d'avoir une mise à jour sur le statut des participants puisque l'asthme et l'allergie sont des conditions variables dans le temps. Il est donc possible que, selon nos critères de sélection des asthmatiques, certains phénotypes soient appelés à changer concernant l'asthme et l'allergie. Ainsi, les groupes utilisés pour les analyses n'auraient plus la même taille et pourraient ainsi influencer les résultats obtenus. Ceci nous permettra également d'obtenir une estimation du pourcentage de changement au niveau du phénotype qui pourra servir dans une analyse de l'évolution de la méthylation en fonction du changement de la condition respiratoire dans le temps.

Les données obtenues dans le présent projet permettront également de mettre en évidence certains patrons de méthylation T CD4+ qui sont associés aux changements phénotypiques avec le

temps. Afin d'avoir une comparaison plus fidèle, les échantillons d'ADN du premier recrutement pour les mêmes participants ont été envoyés aux collaborateurs du présent projet. Il sera ainsi possible de comparer les mêmes données de méthylation obtenues par MCC-seq. Un ajustement de ces résultats en tenant compte de l'hétérogénéité cellulaire sera nécessaire avant de pouvoir comparer les données puisque l'ADN du premier recrutement a été obtenu à partir du sang complet [225].

À plus long terme, il serait aussi pertinent d'étudier d'autres marques épigénétiques dans ces échantillons cellulaires purifiés. En effet, la méthylation à elle seule ne peut expliquer en totalité de contrôle épigénétique qui s'effectue chez les asthmatiques. D'autres marques épigénétiques peuvent être recensées sur le génome complet. C'est le cas des modifications au niveau des histones qui peuvent être étudiées grâce à l'étude par immunoprécipitation des protéines fixées à l'ADN (ChIP-seq) ou encore l'étude de la conformation de l'ADN et l'accessibilité des TSS grâce à la technique de NOME-seq [22].

Dans une perspective plus large, les données générées par ce projet pourront contribuer à l'effort de recherche visant à mieux catégoriser les types d'asthme en combinant non seulement les données cliniques mais aussi les données moléculaires. Ultimement, si la classification de l'asthme est plus précise, les diagnostics le seront aussi, permettant une meilleure prise en charge des individus atteints d'asthme. En combinant les données de ce projet avec celles d'un autre projet connexe portant sur des échantillons d'éosinophiles purifiés, il sera ainsi possible de mieux caractériser le type d'asthme de notre échantillon et d'identifier un patron moléculaire pour ces deux types cellulaires en lien avec les phénotypes cliniques observés.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Holgate, S.T., et al., *Asthma*. Nat Rev Dis Primers, 2015. 1: p. 15025.
2. OMS, (organisation mondiale de la santé). *L'asthme*. 2017 [cited 2017 2 février]; Available from: <http://www.who.int/respiratory/asthma/fr/>.
3. Statistique Canada. *Asthme*, 2014. 2014 [cited 2017 2 février]; Available from: <http://www.statcan.gc.ca/pub/82-625-x/2015001/article/14179-fra.htm>.
4. Boulet, L.-P., *Pathophysiologie de l'asthme*, in *Physiopathologie respiratoire appliquée*. 2013, Presses de l'Université Laval: Québec. p. 83-110.
5. Ismaila, A.S., et al., *Clinical, economic, and humanistic burden of asthma in Canada: a systematic review*. BMC Pulm Med, 2013. 13: p. 70.
6. Asthma Society of Canada. *Asthma Facts and Statistics FAQs*. 2017 [cited 2017 10 mai]; Available from: [http://www.asthma.ca/adults/about/asthma\\_facts\\_and\\_statistics.pdf](http://www.asthma.ca/adults/about/asthma_facts_and_statistics.pdf).
7. Toskala, E. and D.W. Kennedy, *Asthma risk factors*. Int Forum Allergy Rhinol, 2015. 5 Suppl 1: p. S11-6.
8. Yunginger, J.W., et al., *A community-based study of the epidemiology of asthma. Incidence rates, 1964-1983*. Am Rev Respir Dis, 1992. 146(4): p. 888-94.
9. Custovic, A., et al., *EAACI position statement on asthma exacerbations and severe asthma*. Allergy, 2013. 68(12): p. 1520-31.
10. Fu, L., et al., *Natural progression of childhood asthma symptoms and strong influence of sex and puberty*. Ann Am Thorac Soc, 2014. 11(6): p. 939-44.
11. Upham, J.W. and A.L. James, *Remission of asthma: The next therapeutic frontier?* Pharmacology & Therapeutics, 2011. 130(1): p. 38-45.
12. Asthma Society of Canada. *Treatments*. 2017 [cited 2017 9 février]; Available from: <http://www.asthma.ca/adults/treatment/relievers.php>.
13. Calhoun, W.J., *Heterogeneity of Response to Therapy*, in *Heterogeneity in Asthma*, Springer, Editor. 2014: New York. p. 354.
14. Pillai, R.A. and W.J. Calhoun, *Introduction to Asthma and Phenotyping*, in *Heterogeneity in Asthma*. 2014, Springer: New York. p. 354.
15. Handoyo, S. and L.J. Rosenwasser, *Asthma phenotypes*. Curr Allergy Asthma Rep, 2009. 9(6): p. 439-45.
16. Wenzel, S.E., *Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches*. Nat Med, 2012. 18(5): p. 716-25.
17. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. 5 ed. 2016, Issy-les-Moulineaux: Elsevier.
18. GINA, (Global Initiative for Asthma). 2016 [cited 2016 13 février]; Available from: <http://ginasthma.org/2016-pocket-guide-for-asthma-management-and-prevention/>.
19. Haldar, P. and I.D. Pavord, *Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype*. J Allergy Clin Immunol, 2007. 119(5): p. 1043-52; quiz 1053-4.
20. Holgate, S.T., *Innate and adaptive immune responses in asthma*. Nat Med, 2012. 18(5): p. 673-83.
21. Robinson, D.S., et al., *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. N Engl J Med, 1992. 326(5): p. 298-304.
22. Pascual, M. and S.R. Gómez, *Epigenetic Approaches to Allergy Research*. 2013: Springer New York.
23. Hamid, Q. and M. Tulic, *Immunobiology of asthma*. Annu Rev Physiol, 2009. 71: p. 489-507.
24. Sallmann, E., et al., *High-affinity IgE receptors on dendritic cells exacerbate Th2-dependent inflammation*. J Immunol, 2011. 187(1): p. 164-71.
25. Ganesan, S., A.T. Comstock, and U.S. Sajjan, *Barrier function of airway tract epithelium*. Tissue Barriers, 2013. 1(4): p. e24997.
26. Aubier, M., et al., *Traité de pneumologie - 2e ed*. 2009: Lavoisier.

27. Lloyd, C.M. and S. Saglani, *Epithelial cytokines and pulmonary allergic inflammation*. Curr Opin Immunol, 2015. **34**: p. 52-8.
28. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The airway epithelium in asthma*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 684-92.
29. Erle, D.J. and D. Sheppard, *The cell biology of asthma*. J Cell Biol, 2014. **205**(5): p. 621-31.
30. Hall, S. and D.K. Agrawal, *Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma*. Int Immunopharmacol, 2014. **23**(1): p. 316-29.
31. Singh, R.K., et al., *Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics*. Pharmacology, 2010. **85**(6): p. 336-49.
32. Jutel, M., K. Blaser, and C.A. Akdis, *Histamine in allergic inflammation and immune modulation*. Int Arch Allergy Immunol, 2005. **137**(1): p. 82-92.
33. Arima, M. and T. Fukuda, *Prostaglandin D(2) and T(H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma*. Korean J Intern Med, 2011. **26**(1): p. 8-18.
34. Sokol, C.L., et al., *A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses*. Nat Immunol, 2008. **9**(3): p. 310-8.
35. Ling, M.F. and A.D. Luster, *Allergen-Specific CD4(+) T Cells in Human Asthma*. Ann Am Thorac Soc, 2016. **13 Suppl 1**: p. S25-30.
36. Zhu, J. and W.E. Paul, *Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors*. Immunol Rev, 2010. **238**(1): p. 247-62.
37. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
38. Hirahara, K. and T. Nakayama, *CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm*. Int Immunol, 2016. **28**(4): p. 163-71.
39. Elias, J.A., et al., *Airway remodeling in asthma*. J Clin Invest, 1999. **104**(8): p. 1001-6.
40. Kelly, E.A., et al., *The effect of segmental bronchoprovocation with allergen on airway lymphocyte function*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(5): p. 1421-8.
41. Gour, N. and M. Wills-Karp, *IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease*. Cytokine, 2015. **75**(1): p. 68-78.
42. Muehling, L.M., M.G. Lawrence, and J.A. Woodfolk, *Pathogenic CD4+ T cells in patients with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2017.
43. Robinson, D.S., et al., *Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness*. Thorax, 1993. **48**(1): p. 26-32.
44. Naji, N., et al., *T helper 17 cells and related cytokines after allergen inhalation challenge in allergic asthmatics*. Int Arch Allergy Immunol, 2014. **165**(1): p. 27-34.
45. Kratzer, B. and W.F. Pickl, *Years in Review: Recent Progress in Cellular Allergology*. Int Arch Allergy Immunol, 2016. **169**(1): p. 1-12.
46. Tan, H.-L. and M. Rosenthal, *IL-17 in lung disease: friend or foe?* Thorax, 2013. **68**: p. 788-790.
47. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-76.
48. Durrant, D.M. and D.W. Metzger, *Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma*. Immunol Invest, 2010. **39**(4-5): p. 526-49.
49. Erpenbeck, V.J., et al., *Increased expression of interleukin-9 messenger RNA after segmental allergen challenge in allergic asthmatics*. Chest, 2003. **123**(3 Suppl): p. 370S.
50. Soroosh, P. and T.A. Doherty, *Th9 and allergic disease*. Immunology, 2009. **127**(4): p. 450-8.
51. Koch, S., N. Sopel, and S. Finotto, *Th9 and other IL-9-producing cells in allergic asthma*. Semin Immunopathol, 2017. **39**(1): p. 55-68.
52. Nowak, E.C., et al., *IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease*. J Exp Med, 2009. **206**(8): p. 1653-60.
53. Wing, K., Z. Fehervari, and S. Sakaguchi, *Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells*. Int Immunol, 2006. **18**(7): p. 991-1000.

54. Lewkowich, I.P., et al., *CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function*. J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1549-61.
55. Daniel, C., et al., *Enhancement of antigen-specific Treg vaccination in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(37): p. 16246-51.
56. Hogan, S.P., et al., *Eosinophils: biological properties and role in health and disease*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(5): p. 709-50.
57. Dente, F.L., et al., *Can Sputum Eosinophilia Be a Constant Feature in Severe Refractory Asthmatics? A 3-Year Longitudinal Study*. Int Arch Allergy Immunol, 2015. **166**(4): p. 287-90.
58. Peters, M.S., M. Rodriguez, and G.J. Gleich, *Localization of human eosinophil granule major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin by immunoelectron microscopy*. Lab Invest, 1986. **54**(6): p. 656-62.
59. Egesten, A., et al., *Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophil peroxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique*. J Histochem Cytochem, 1986. **34**(11): p. 1399-403.
60. Fehrenbach, H., C. Wagner, and M. Wegmann, *Airway remodeling in asthma: what really matters*. Cell Tissue Res, 2017. **367**(3): p. 551-569.
61. Humbles, A.A., et al., *A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling*. Science, 2004. **305**(5691): p. 1776-9.
62. Gleich, G.J., C.R. Adolphson, and K.M. Leiferman, *The biology of the eosinophilic leukocyte*. Annu Rev Med, 1993. **44**: p. 85-101.
63. Xie, S., et al., *Mechanisms of induction of airway smooth muscle hyperplasia by transforming growth factor-beta*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(1): p. L245-53.
64. Michalik, M., et al., *Asthmatic bronchial fibroblasts demonstrate enhanced potential to differentiate into myofibroblasts in culture*. Med Sci Monit, 2009. **15**(7): p. BR194-201.
65. Nakagome, K., S. Matsushita, and M. Nagata, *Neutrophilic inflammation in severe asthma*. Int Arch Allergy Immunol, 2012. **158 Suppl 1**: p. 96-102.
66. Sackmann, E.K., et al., *Characterizing asthma from a drop of blood using neutrophil chemotaxis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(16): p. 5813-8.
67. Liu, J., et al., *Advanced Role of Neutrophils in Common Respiratory Diseases*. J Immunol Res, 2017. **2017**: p. 6710278.
68. Hosoki, K., et al., *Neutrophil recruitment by allergens contribute to allergic sensitization and allergic inflammation*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2016. **16**(1): p. 45-50.
69. Holgate, S.T., *Epithelium dysfunction in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(6): p. 1233-44; quiz 1245-6.
70. Bergeron, C., W. Al-Ramli, and Q. Hamid, *Remodeling in asthma*. Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(3): p. 301-5.
71. Bai, T.R., et al., *The effect of age and duration of disease on airway structure in fatal asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(2 Pt 1): p. 663-9.
72. Johnson, P.R. and J.K. Burgess, *Airway smooth muscle and fibroblasts in the pathogenesis of asthma*. Curr Allergy Asthma Rep, 2004. **4**(2): p. 102-8.
73. Chogtu, B., D. Bhattacharjee, and R. Magazine, *Epigenetics: The New Frontier in the Landscape of Asthma*. Scientifica, 2016. **2016**: p. 4638949.
74. Mathias, R.A., *Introduction to Genetics and Genomics in Asthma: Genetics of Asthma*, in *Heterogeneity in Asthma*, Springer, Editor. 2014: New York. p. 354.
75. Edfors-Lubs, M.L., *Allergy in 7000 twin pairs*. Acta Allergol, 1971. **26**(4): p. 249-85.
76. Alberts, B., et al., *L'essentiel de la biologie cellulaire*. 3e ed. 2010, Paris: Lavoisier Médecine Sciences. 864.
77. Thomsen, S.F., *Genetics of asthma: an introduction for the clinician*. European Clinical Respiratory Journal, 2015. **2**: p. 10.3402/ecrj.v2.24643.
78. Peyser, P.A. and T.L. Burns, *Approaches to quantify the genetic component of and identify genes for complex traits*, in *Human Genome Epidemiology, 2nd Edition: Building the Evidence for Using Genetic*

- Information to Improve Health and Prevent Disease, M. Khoury, Editor. 2010, Oxford University Press, USA.
79. Laitinen, T., et al., *Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits*. Science, 2004. **304**(5668): p. 300-4.
  80. Van Eerdewegh, P., et al., *Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness*. Nature, 2002. **418**(6896): p. 426-30.
  81. Lee, J.-U., J.D. Kim, and C.-S. Park, *Gene-Environment Interactions in Asthma: Genetic and Epigenetic Effects*. Yonsei Medical Journal, 2015. **56**(4): p. 877-886.
  82. Vercelli, D., *Discovering susceptibility genes for asthma and allergy*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 169-82.
  83. NIH, National Human Genome Research Institute. *Genome-Wide Association Studies*. 2017 [cited 2017 1er août]; Available from: <https://www.genome.gov/20019523/>.
  84. Akhbari, L. and A.J. Sandford, *Genome-wide association studies for discovery of genes involved in asthma*. Respirology, 2011. **16**(3): p. 396-406.
  85. Sudmant, P.H., et al., *An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes*. Nature, 2015. **526**(7571): p. 75-81.
  86. Abecasis, G.R., et al., *An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 56-65.
  87. Manolio, T., *Case-control and cohort studies in the age of genome-wide associations*, in *Human Genome Epidemiology, 2nd Edition: Building the evidence for using genetic information to improve health and prevent disease*. 2010, Oxford University Press: New York. p. 704 p.
  88. EMBL-EBI, National Human Genome Research Institute and the European Bioinformatics Institute. *GWAS Catalog*. 2017 [cited 2017 19 juin]; Available from: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=asthma>.
  89. Garcia-Sanchez, A., et al., *Genome-wide association studies (GWAS) and their importance in asthma*. Allergol Immunopathol (Madr), 2015. **43**(6): p. 601-8.
  90. Moffatt, M.F., et al., *Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 470-3.
  91. Ferreira, M.A., et al., *Association between ORMDL3, IL1RL1 and a deletion on chromosome 17q21 with asthma risk in Australia*. Eur J Hum Genet, 2011. **19**(4): p. 458-64.
  92. Moffatt, M.F., et al., *A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma*. N Engl J Med, 2010. **363**(13): p. 1211-1221.
  93. Torgerson, D.G., et al., *Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations*. Nat Genet, 2011. **43**(9): p. 887-92.
  94. Wan, Y.I., et al., *Genome-wide association study to identify genetic determinants of severe asthma*. Thorax, 2012. **67**(9): p. 762-8.
  95. Bonnelykke, K., et al., *A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations*. Nat Genet, 2014. **46**(1): p. 51-5.
  96. Ferreira, M.A., et al., *Genome-wide association analysis identifies 11 risk variants associated with the asthma with hay fever phenotype*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(6): p. 1564-71.
  97. Marenholz, I., et al., *Meta-analysis identifies seven susceptibility loci involved in the atopic march*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8804.
  98. Pickrell, J.K., et al., *Detection and interpretation of shared genetic influences on 42 human traits*. Nat Genet, 2016. **48**(7): p. 709-17.
  99. Madore, A.M., et al., *Replication of an association between 17q21 SNPs and asthma in a French-Canadian familial collection*. Hum Genet, 2008. **123**(1): p. 93-5.
  100. Galanter, J., et al., *ORMDL3 gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(11): p. 1194-200.
  101. Gudbjartsson, D.F., et al., *Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction*. Nat Genet, 2009. **41**(3): p. 342-7.

102. Gordon, E.D., et al., *IL1RL1 asthma risk variants regulate airway type 2 inflammation*. JCI Insight, 2016. **1**(14): p. e87871.
103. Ober, C., *Asthma Genetics in the Post-GWAS Era*. Ann Am Thorac Soc, 2016. **13 Suppl 1**: p. S85-90.
104. Campbell, C.D., et al., *Whole-genome sequencing of individuals from a founder population identifies candidate genes for asthma*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104396.
105. Waddington, C.H., *The epigenotype*. 1942. Int J Epidemiol, 2012. **41**(1): p. 10-3.
106. Berger, S.L., et al., *An operational definition of epigenetics*. Genes & Development, 2009. **23**(7): p. 781-783.
107. Salam, M.T., *Asthma Epigenetics*, in *Heterogeneity in Asthma*, Springer, Editor. 2014: New York. p. 354.
108. Renaudineau, Y. and P. Youinou, *Epigenetics and autoimmunity, with special emphasis on methylation*. Keio J Med, 2011. **60**(1): p. 10-6.
109. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
110. Allis, C.D. and T. Jenuwein, *The molecular hallmarks of epigenetic control*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(8): p. 487-500.
111. Read, A., et al., *Génétique médicale: De la biologie à la pratique clinique*. 2008, Bruxelles: De Boeck Supérieur. 488.
112. Suzuki, M.M. and A. Bird, *DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(6): p. 465-76.
113. Eckhardt, F., et al., *DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22*. Nat Genet, 2006. **38**(12): p. 1378-85.
114. Martienssen, R. and D. Moazed, *RNAi and heterochromatin assembly*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(8): p. a019323.
115. DeVries, A. and D. Vercelli, *Epigenetic Mechanisms in Asthma*. Ann Am Thorac Soc, 2016. **13 Suppl 1**: p. S48-50.
116. Ho, S.M., *Environmental epigenetics of asthma: an update*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(3): p. 453-65.
117. Glass, J.L., et al., *CG dinucleotide clustering is a species-specific property of the genome*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(20): p. 6798-807.
118. Zampieri, M., et al., *Reconfiguration of DNA methylation in aging*. Mech Ageing Dev, 2015. **151**: p. 60-70.
119. Huang, Q., *Genetic study of complex diseases in the post-GWAS era*. J Genet Genomics, 2015. **42**(3): p. 87-98.
120. Heyn, H., *A symbiotic liaison between the genetic and epigenetic code*. Front Genet, 2014. **5**: p. 113.
121. Zeng, W.P., *'All things considered': transcriptional regulation of T helper type 2 cell differentiation from precursor to effector activation*. Immunology, 2013. **140**(1): p. 31-8.
122. Kwon, N.H., et al., *DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma*. J Clin Immunol, 2008. **28**(2): p. 139-46.
123. Brand, S., et al., *DNA methylation of TH1/TH2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(6): p. 1602-10 e6.
124. Bégin, P. and K.C. Nadeau, *Epigenetic regulation of asthma and allergic disease*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2014. **10**(1): p. 27.
125. Al Tuwaijri, A., et al., *Local genotype influences DNA methylation at two asthma-associated regions, 5q31 and 17q21, in a founder effect population*. J Med Genet, 2016. **53**(4): p. 232-41.
126. Liang, L., et al., *An epigenome-wide association study of total serum immunoglobulin E concentration*. Nature, 2015. **520**(7549): p. 670-674.
127. Butland, B.K. and D.P. Strachan, *Asthma onset and relapse in adult life: the British 1958 birth cohort study*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2007. **98**(4): p. 337-43.
128. Almquist, C., M. Worm, and B. Leynaert, *Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA2LEN review*. Allergy, 2008. **63**(1): p. 47-57.



129. Naumova, A.K., et al., *Sex- and age-dependent DNA methylation at the 17q12-q21 locus associated with childhood asthma*. Hum Genet, 2013. **132**(7): p. 811-22.
130. Tantisira, K.G., et al., *Airway responsiveness in mild to moderate childhood asthma: sex influences on the natural history*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(4): p. 325-31.
131. Divekar, R. and W.J. Calhoun, *Heterogeneity of Asthma in Society*, in *Heterogeneity in Asthma*, Springer, Editor. 2014: New York. p. 354.
132. Boulet, L.P., *Asthma and obesity*. Clin Exp Allergy, 2013. **43**(1): p. 8-21.
133. Beuther, D.A. and E.R. Sutherland, *Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(7): p. 661-6.
134. Mebrahtu, T.F., et al., *Childhood body mass index and wheezing disorders: a systematic review and meta-analysis*. Pediatr Allergy Immunol, 2015. **26**(1): p. 62-72.
135. Tantisira, K.G., et al., *Association of body mass with pulmonary function in the Childhood Asthma Management Program (CAMP)*. Thorax, 2003. **58**(12): p. 1036-41.
136. Juge-Aubry, C.E., E. Henrichot, and C.A. Meier, *Adipose tissue: a regulator of inflammation*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2005. **19**(4): p. 547-66.
137. Ferrante, A.W., Jr., *Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation*. J Intern Med, 2007. **262**(4): p. 408-14.
138. Lawson, J.A., et al., *Urban-rural differences in asthma prevalence among young people in Canada: the roles of health behaviors and obesity*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2011. **107**(3): p. 220-8.
139. Guarnieri, M. and J.R. Balmes, *Outdoor air pollution and asthma*. Lancet, 2014. **383**(9928): p. 1581-92.
140. Fuchs, O., et al., *Farming environments and childhood atopy, wheeze, lung function, and exhaled nitric oxide*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(2): p. 382-8 e6.
141. Vandenplas, O., *Occupational Asthma: Etiologies and Risk Factors*. Allergy Asthma Immunol Res, 2011. **3**(3): p. 157-67.
142. Kogevinas, M., et al., *Exposure to substances in the workplace and new-onset asthma: an international prospective population-based study (ECRHS-II)*. Lancet, 2007. **370**(9584): p. 336-41.
143. Jackson, D.J. and R.F. Lemanske, Jr., *The role of respiratory virus infections in childhood asthma inception*. Immunol Allergy Clin North Am, 2010. **30**(4): p. 513-22, vi.
144. Stampfli, M.R. and G.P. Anderson, *How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 377-84.
145. Burke, H., et al., *Prenatal and passive smoke exposure and incidence of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis*. Pediatrics, 2012. **129**(4): p. 735-44.
146. Alati, R., et al., *In utero and postnatal maternal smoking and asthma in adolescence*. Epidemiology, 2006. **17**(2): p. 138-44.
147. Laprise, C., *The Saguenay-Lac-Saint-Jean asthma familial collection: the genetics of asthma in a young founder population*. Genes Immun, 2014. **15**(4): p. 247-55.
148. Moreau, C., H. Vézina, and D. Labuda, *Effets fondateurs et variabilité génétique au Québec*. Med Sci (Paris), 2007. **23**(11): p. 1008-1013.
149. Jetté, R., D. Gauvreau, and M. Guérin, *Aux origines d'une région: le peuplement fondateur de Charlevoix avant 1850*, in *Histoire d'un génome*. 1990, Presses de l'Université du Québec: Québec. p. 75.
150. Charbonneau, H., et al., *The population of St. Lawrence valley, 1608-1760*, in *A population history of north america*. 2000, Cambridge University Press: Cambridge. p. 99.
151. CORAMH, (Corporation de recherche et d'action sur les maladies héréditaires). *L'effet fondateur*. 2017 [cited 2017 1er mars]; Available from: <http://www.coramh.org/heredite-et-genetique/leffet-fondateur.html>.
152. Shifman, S. and A. Darvasi, *The value of isolated populations*. Nat Genet, 2001. **28**(4): p. 309-10.
153. Girard, C. and N. Perron, *Histoire du Saguenay-Lac-Saint-Jean*. 1989: Institut Québécois de Recherche sur la Culture.

154. Vézina, H., M. Tremblay, and L. Houde, *Mesures de l'apparentement biologique au Saguenay-Lac-Saint-Jean (Québec, Canada) à partir de reconstructions généalogiques*. Annales de démographie historique, 2004. **108**: p. 67-83.
155. Forstner, A.J., et al., *Genome-wide analysis implicates microRNAs and their target genes in the development of bipolar disorder*. Transl Psychiatry, 2015. **5**: p. e678.
156. Alizadeh, Z., et al., *Role of Epigenetics in the Pathogenesis of Asthma*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2017. **16**(2): p. 82-91.
157. Uhm, T.G., B.S. Kim, and I.Y. Chung, *Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma*. Allergy Asthma Immunol Res, 2012. **4**(2): p. 68-79.
158. Lu, Y., et al., *Impact of Ficoll density gradient centrifugation on major and trace element concentrations in erythrocytes and blood plasma*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2015. **29**: p. 249-254.
159. Ewing, B., et al., *Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment*. Genome Res, 1998. **8**(3): p. 175-85.
160. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel, *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics, 2014. **30**(15): p. 2114-20.
161. Krueger, F. and S.R. Andrews, *Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications*. Bioinformatics, 2011. **27**(11): p. 1571-2.
162. Langmead, B. and S.L. Salzberg, *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. Nat Methods, 2012. **9**(4): p. 357-9.
163. Amemiya, H.M., A. Kundaje, and A.P. Boyle, *The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 9354.
164. Rio, D.C., et al., *Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent)*. Cold Spring Harb Protoc, 2010. **2010**(6): p. pdb.prot5439.
165. Trapnell, C., L. Pachter, and S.L. Salzberg, *TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq*. Bioinformatics, 2009. **25**(9): p. 1105-11.
166. Anders, S., P.T. Pyl, and W. Huber, *HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data*. Bioinformatics, 2015. **31**(2): p. 166-9.
167. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biol, 2014. **15**(12): p. 550.
168. Scheet, P. and M. Stephens, *A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase*. Am J Hum Genet, 2006. **78**(4): p. 629-44.
169. Delaneau, O., J. Marchini, and J.F. Zagury, *A linear complexity phasing method for thousands of genomes*. Nat Methods, 2011. **9**(2): p. 179-81.
170. Howie, B.N., P. Donnelly, and J. Marchini, *A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies*. PLoS Genet, 2009. **5**(6): p. e1000529.
171. Nelder, J.A. and R.W.M. Wedderburn, *Generalized Linear Models*. Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General), 1972. **135**(3): p. 370-384.
172. Leek, J.T., et al., *The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments*. Bioinformatics, 2012. **28**(6): p. 882-3.
173. Assenov, Y., et al., *Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads*. Nat Methods, 2014. **11**(11): p. 1138-1140.
174. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing*. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological), 1995. **57**(1): p. 289-300.
175. Shabalin, A.A., *Matrix eQTL: ultra fast eQTL analysis via large matrix operations*. Bioinformatics, 2012. **28**(10): p. 1353-8.
176. Wilcox, R.R., *Fundamentals of Modern Statistical Methods: Substantially Improving Power and Accuracy*. 2010: Springer New York.

177. Yamashita, K., et al., *Epigenetic biomarkers of promoter DNA methylation in the new era of cancer treatment*. Cancer Sci, 2018. **109**(12): p. 3695-3706.
178. Varley, K.E., et al., *Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues*. Genome Res, 2013. **23**(3): p. 555-67.
179. Yang, X., et al., *Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer*. Cancer Cell, 2014. **26**(4): p. 577-90.
180. Fagerberg, L., et al., *Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2014. **13**(2): p. 397-406.
181. Milosevic, N., et al., *Synthetic lethality screen identifies RPS6KA2 as modifier of epidermal growth factor receptor activity in pancreatic cancer*. Neoplasia, 2013. **15**(12): p. 1354-62.
182. Holgate, S.T., *The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis*. Immunol Rev, 2011. **242**(1): p. 205-19.
183. Hamilton, L.M., et al., *The role of the epidermal growth factor receptor in sustaining neutrophil inflammation in severe asthma*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(2): p. 233-40.
184. Hassan, M., et al., *Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(5): p. 1037-1045.e3.
185. Takeuchi, S. and M. Ando, *Marginal cells of the stria vascularis of gerbils take up glucose via the facilitated transporter GLUT: application of autofluorescence*. Hear Res, 1997. **114**(1-2): p. 69-74.
186. Rothlin, C.V., et al., *TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1124-36.
187. Gao, L., et al., *Epigenetic regulation of AXL and risk of childhood asthma symptoms*. Clin Epigenetics, 2017. **9**: p. 121.
188. Mahn, K., et al., *Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodelling in bronchial asthma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(26): p. 10775-80.
189. Janssens, R., S. Struyf, and P. Proost, *Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12*. Cytokine Growth Factor Rev, 2018. **44**: p. 51-68.
190. Vitiello, L., et al., *CXCL12 prolongs naive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes survival via activation of PKA, CREB and Bcl2 and BclXI up-regulation*. Int J Cardiol, 2016. **224**: p. 206-212.
191. Mizutani, N., T. Nabe, and S. Yoshino, *IL-17A promotes the exacerbation of IL-33-induced airway hyperresponsiveness by enhancing neutrophilic inflammation via CXCR2 signaling in mice*. J Immunol, 2014. **192**(4): p. 1372-84.
192. Di Stefano, A., et al., *Association of increased CCL5 and CXCL7 chemokine expression with neutrophil activation in severe stable COPD*. Thorax, 2009. **64**(11): p. 968-75.
193. Rohde, G., et al., *CXC chemokines and antimicrobial peptides in rhinovirus-induced experimental asthma exacerbations*. Clin Exp Allergy, 2014. **44**(7): p. 930-9.
194. Postma, D.S., et al., *Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: similarities and differences*. Clin Chest Med, 2014. **35**(1): p. 143-56.
195. Woo, H.N., et al., *Inhibition of Bcl10-mediated activation of NF-kappa B by BinCARD, a Bcl10-interacting CARD protein*. FEBS Lett, 2004. **578**(3): p. 239-44.
196. Gehring, T., T. Seeholzer, and D. Krappmann, *BCL10 - Bridging CARDs to Immune Activation*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1539.
197. Hart, L.A., et al., *Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(5 Pt 1): p. 1585-92.
198. Schuliga, M., *NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease*. Biomolecules, 2015. **5**(3): p. 1266-83.
199. Das, J., et al., *A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation*. Nat Immunol, 2001. **2**(1): p. 45-50.
200. Rickel, E.A., et al., *Identification of functional roles for both IL-17RB and IL-17RA in mediating IL-25-induced activities*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 4299-310.

201. Tumes, D.J., et al., *Epigenetic regulation of T-helper cell differentiation, memory, and plasticity in allergic asthma*. Immunol Rev, 2017. **278**(1): p. 8-19.
202. Oda, N., et al., *Interleukin-17F induces pulmonary neutrophilia and amplifies antigen-induced allergic response*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(1): p. 12-8.
203. Angkasekwina, P., et al., *Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1509-17.
204. Willis, C.R., et al., *IL-17RA Signaling in Airway Inflammation and Bronchial Hyperreactivity in Allergic Asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015. **53**(6): p. 810-21.
205. Hunninghake, G.M., et al., *The CD4+ T-cell transcriptome and serum IgE in asthma: IL17RB and the role of sex*. BMC Pulm Med, 2011. **11**: p. 17.
206. Iinuma, T., et al., *Interleukin-25 and mucosal T cells in noneosinophilic and eosinophilic chronic rhinosinusitis*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2015. **114**(4): p. 289-98.
207. Letuve, S., et al., *IL-17E upregulates the expression of proinflammatory cytokines in lung fibroblasts*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(3): p. 590-6.
208. Hernandez-Pacheco, N., et al., *Genome-wide association study of inhaled corticosteroid response in admixed children with asthma*. Clin Exp Allergy, 2019. **49**(6): p. 789-798.
209. Suttner, K., et al., *HLX1 gene variants influence the development of childhood asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(1): p. 82-88.e6.
210. Murphy, T.M., et al., *Methylomic markers of persistent childhood asthma: a longitudinal study of asthma-discordant monozygotic twins*. Clin Epigenetics, 2015. **7**: p. 130.
211. Li, F., et al., *Quantitative assessment of the association between the GSTM1-null genotype and the risk of childhood asthma*. Genet Test Mol Biomarkers, 2013. **17**(9): p. 656-61.
212. Turner, S., et al., *Variants in genes coding for glutathione S-transferases and asthma outcomes in children*. Pharmacogenomics, 2018. **19**(8): p. 707-713.
213. Yang, I.V., et al., *The clinical and environmental determinants of airway transcriptional profiles in allergic asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(6): p. 620-7.
214. Nigo, Y.I., et al., *Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2286-91.
215. Li, L.T., et al., *Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review)*. Mol Med Rep, 2015. **11**(3): p. 1566-72.
216. Cohen, L., et al., *Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(2): p. 138-45.
217. Fukushima, K., et al., *FIP1L1-PDGFRalpha imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(12): p. 7719-32.
218. van Vliet, S.J., et al., *MGL signaling augments TLR2-mediated responses for enhanced IL-10 and TNF-alpha secretion*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(2): p. 315-23.
219. Raeiszadeh Jahromi, S., et al., *Serum levels of IL-10, IL-17F and IL-33 in patients with asthma: a case-control study*. J Asthma, 2014. **51**(10): p. 1004-13.
220. Zhong, H., et al., *Predicting gene expression using DNA methylation in three human populations*. PeerJ, 2019. **7**: p. e6757.
221. Buenrostro, J.D., et al., *ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide*. Curr Protoc Mol Biol, 2015. **109**: p. 21.29.1-9.
222. Goodwin, S., J.D. McPherson, and W.R. McCombie, *Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(6): p. 333-51.
223. NCBI. *NCBI Homo sapiens Annotation Release 108*. 2019 [cited 2019; Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_euk/Homo\\_sapiens/108/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/Homo_sapiens/108/)].
224. Ma, T. and A. Zhang, *Omics Informatics: From Scattered Individual Software Tools to Integrated Workflow Management Systems*. IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform, 2017. **14**(4): p. 926-946.
225. Teschendorff, A.E. and C.L. Relton, *Statistical and integrative system-level analysis of DNA methylation data*. Nat Rev Genet, 2018. **19**(3): p. 129-147.

## Annexe I

Le tableau suivant regroupe tous les résultats de méthylation significatifs ( $FDR \leq 0,05$ ) pour les CpG situés dans les promoteurs des gènes et dont la valeur de  $\Delta\text{-meth} \geq 5\%$  pour le phénotype asthme. Ce tableau a été mis en annexe dans le but d'alléger la section résultats du présent document.

CpG	Chr	Position	Gène	$\Delta\text{-meth}$ (%)	P-value	FDR
11.0_17499197	11	17 499 197	<i>ABCC8</i>	-9,30	7,83E-05	1,15E-03
9.0_19408573	9	19 408 573	<i>ACER2</i>	5,69	1,74E-04	2,55E-03
2.0_237477610	2	237 477 610	<i>ACKR3</i>	-5,08	4,87E-05	7,17E-04
10.0_134900733	10	134 900 733	<i>ADGRA1-AS1</i>	-6,90	4,20E-04	6,10E-03
10.0_134900747	10	134 900 747	<i>ADGRA1-AS1</i>	-6,47	1,48E-04	2,16E-03
10.0_134900857	10	134 900 857	<i>ADGRA1-AS1</i>	5,74	3,88E-04	5,64E-03
8.0_37654184	8	37 654 184	<i>ADGRA2</i>	6,30	8,44E-04	1,21E-02
2.0_236401984	2	236 401 984	<i>AGAP1</i>	-5,53	1,08E-03	1,54E-02
14.0_105445253	14	105 445 253	<i>AHNAK2</i>	-6,14	1,51E-03	2,14E-02
21.0_15352790	21	15 352 790	<i>ANKRD20A11P</i>	-5,78	2,37E-04	3,46E-03
21.0_15352801	21	15 352 801	<i>ANKRD20A11P</i>	-6,25	7,45E-04	1,07E-02
21.0_15352804	21	15 352 804	<i>ANKRD20A11P</i>	-8,49	5,77E-07	8,54E-06
21.0_15352820	21	15 352 820	<i>ANKRD20A11P</i>	-6,55	1,28E-03	1,82E-02
21.0_15352828	21	15 352 828	<i>ANKRD20A11P</i>	-7,95	3,71E-07	5,50E-06
21.0_15352851	21	15 352 851	<i>ANKRD20A11P</i>	-6,16	3,88E-04	5,64E-03
21.0_15353069	21	15 353 069	<i>ANKRD20A11P</i>	-5,05	1,53E-03	2,17E-02
21.0_15353078	21	15 353 078	<i>ANKRD20A11P</i>	-5,95	1,09E-03	1,56E-02
19.0_2152216	19	2 152 216	<i>AP3D1</i>	5,43	1,84E-03	2,59E-02
19.0_36265694	19	36 265 694	<i>ARHGAP33</i>	-6,62	3,42E-04	4,99E-03
7.0_65540429	7	65 540 429	<i>ASL</i>	-5,48	1,68E-03	2,37E-02
8.0_47529334	8	47 529 334	<i>ASNSP1</i>	-8,11	2,10E-03	2,94E-02
8.0_47529527	8	47 529 527	<i>ASNSP1</i>	-6,72	1,71E-03	2,41E-02
1.0_161735129	1	161 735 129	<i>ATF6</i>	-7,17	1,03E-03	1,48E-02
7.0_99064026	7	99 064 026	<i>ATP5MF-PTCD1</i>	5,05	2,87E-03	3,97E-02
9.0_117349544	9	117 349 544	<i>ATP6V1G1</i>	-6,15	1,33E-03	1,89E-02
19.0_41724616	19	41 724 616	<i>AXL</i>	5,00	3,33E-03	4,56E-02
17.0_81010149	17	81 010 149	<i>B3GNTL1</i>	5,65	1,75E-03	2,47E-02
9.0_67340403	9	67 340 403	<i>BMS1P14</i>	-5,11	3,86E-04	5,62E-03
9.0_67340411	9	67 340 411	<i>BMS1P14</i>	-5,67	2,32E-03	3,24E-02
9.0_67340416	9	67 340 416	<i>BMS1P14</i>	-5,13	3,58E-03	4,88E-02
9.0_67340440	9	67 340 440	<i>BMS1P14</i>	-6,04	1,74E-03	2,45E-02
9.0_67340451	9	67 340 451	<i>BMS1P14</i>	-5,38	1,77E-04	2,59E-03
9.0_67340466	9	67 340 466	<i>BMS1P14</i>	-5,22	1,98E-04	2,89E-03
9.0_67340527	9	67 340 527	<i>BMS1P14</i>	-5,16	1,92E-03	2,70E-02
9.0_67340547	9	67 340 547	<i>BMS1P14</i>	-5,86	1,83E-04	2,68E-03
9.0_67340559	9	67 340 559	<i>BMS1P14</i>	-6,05	1,77E-05	2,61E-04
9.0_67340565	9	67 340 565	<i>BMS1P14</i>	-5,25	7,67E-06	1,13E-04
9.0_67340607	9	67 340 607	<i>BMS1P14</i>	-5,31	1,59E-07	2,36E-06
9.0_67340622	9	67 340 622	<i>BMS1P14</i>	-5,48	1,59E-06	2,36E-05
9.0_67340633	9	67 340 633	<i>BMS1P14</i>	-6,29	4,36E-09	6,47E-08
17.0_8094064	17	8 094 064	<i>BORCS6</i>	-5,07	1,30E-04	1,90E-03

9.0_132082481	9	132 082 481	<i>C9orf106</i>	5,85	6,26E-05	9,21E-04
22.0_30115691	22	30 115 691	<i>CABP7</i>	6,23	2,84E-03	3,93E-02
22.0_21986744	22	21 986 744	<i>CCDC116</i>	5,04	6,34E-04	9,17E-03
11.0_66084526	11	66 084 526	<i>CD248</i>	-5,59	6,03E-04	8,72E-03
11.0_66084534	11	66 084 534	<i>CD248</i>	-7,35	8,10E-04	1,17E-02
19.0_33863876	19	33 863 876	<i>CEBPG</i>	8,46	6,63E-04	9,58E-03
17.0_41857647	17	41 857 647	<i>CFAP97D1</i>	-5,91	9,00E-05	1,32E-03
16.0_75529662	16	75 529 662	<i>CHST6</i>	6,91	2,64E-03	3,67E-02
14.0_103989865	14	103 989 865	<i>CKB</i>	-8,59	1,36E-03	1,94E-02
16.0_3062338	16	3 062 338	<i>CLDN9</i>	-8,02	3,58E-03	4,88E-02
13.0_77565597	13	77 565 597	<i>CLN5</i>	-6,14	2,41E-03	3,36E-02
13.0_77565607	13	77 565 607	<i>CLN5</i>	-5,48	3,53E-03	4,81E-02
6.0_37400392	6	37 400 392	<i>CMTR1</i>	-7,25	1,02E-03	1,46E-02
22.0_25843113	22	25 843 113	<i>CRYBB2P1</i>	-10,40	4,06E-11	6,02E-10
7.0_151138516	7	151 138 516	<i>CRYGN</i>	9,96	2,16E-07	3,19E-06
7.0_151138528	7	151 138 528	<i>CRYGN</i>	12,95	1,24E-10	1,84E-09
7.0_151138548	7	151 138 548	<i>CRYGN</i>	11,24	1,71E-14	2,53E-13
11.0_65779263	11	65 779 263	<i>CST6</i>	-8,55	3,08E-03	4,23E-02
5.0_180673096	5	180 673 096	<i>CTC-338M12.4</i>	5,76	2,79E-03	3,86E-02
9.0_90387624	9	90 387 624	<i>CTSL3P</i>	6,53	5,78E-04	8,38E-03
16.0_50775301	16	50 775 301	<i>CYLD</i>	8,11	1,96E-03	2,76E-02
2.0_159651808	2	159 651 808	<i>DAPL1</i>	-5,27	2,82E-04	4,12E-03
16.0_90014251	16	90 014 251	<i>DEF8</i>	6,13	7,12E-04	1,03E-02
22.0_32149222	22	32 149 222	<i>DEPDC5</i>	-8,73	1,39E-03	1,97E-02
9.0_140009742	9	140 009 742	<i>DPP7</i>	5,97	3,03E-03	4,18E-02
9.0_37079426	9	37 079 426	<i>EBLN3P</i>	-5,31	3,41E-03	4,67E-02
22.0_37824151	22	37 824 151	<i>ELFN2</i>	5,15	7,03E-04	1,02E-02
10.0_101418416	10	101 418 416	<i>ENTPD7</i>	6,15	1,40E-03	1,99E-02
14.0_100437462	14	100 437 462	<i>EVL</i>	-7,48	4,85E-04	7,04E-03
5.0_177434477	5	177 434 477	<i>FAM153C</i>	-6,99	1,30E-03	1,85E-02
19.0_40440660	19	40 440 660	<i>FCGBP</i>	-5,63	1,16E-03	1,66E-02
19.0_639440	19	639 440	<i>FGF22</i>	-8,70	6,74E-05	9,92E-04
1.0_38472171	1	38 472 171	<i>FHL3</i>	5,85	2,86E-03	3,96E-02
15.0_33487631	15	33 487 631	<i>FMN1</i>	-8,09	2,14E-03	3,00E-02
15.0_33487656	15	33 487 656	<i>FMN1</i>	-5,28	5,56E-04	8,05E-03
9.0_68455666	9	68 455 666	<i>FRG1JP</i>	-5,00	5,30E-04	7,68E-03
9.0_68455676	9	68 455 676	<i>FRG1JP</i>	-5,17	5,34E-05	7,86E-04
1.0_24195659	1	24 195 659	<i>FUCA1</i>	7,57	2,21E-03	3,09E-02
2.0_237077413	2	237 077 413	<i>GBX2</i>	-8,62	1,33E-03	1,89E-02
17.0_61996545	17	61 996 545	<i>GH1</i>	5,28	1,95E-03	2,75E-02
1.0_235814566	1	235 814 566	<i>GNG4</i>	-7,63	2,33E-03	3,26E-02
2.0_157291262	2	157 291 262	<i>GPD2</i>	-5,67	9,98E-04	1,43E-02
5.0_83017228	5	83 017 228	<i>HAPLN1</i>	5,35	3,36E-03	4,60E-02
1.0_32083012	1	32 083 012	<i>HCRTR1</i>	5,82	3,20E-03	4,39E-02
1.0_149785544	1	149 785 544	<i>HIST2H3D</i>	5,73	1,45E-03	2,05E-02
2.0_234763681	2	234 763 681	<i>HJURP</i>	-5,64	1,72E-03	2,43E-02
12.0_54347938	12	54 347 938	<i>HOXC12</i>	-5,37	2,64E-03	3,67E-02
10.0_38645121	10	38 645 121	<i>HSD17B7P2</i>	-5,36	6,84E-04	9,87E-03
10.0_38645157	10	38 645 157	<i>HSD17B7P2</i>	-5,48	1,10E-07	1,64E-06

10.0_38645170	10	38 645 170	<i>HSD17B7P2</i>	-5,31	1,95E-03	2,75E-02
10.0_38645191	10	38 645 191	<i>HSD17B7P2</i>	-6,30	9,53E-06	1,41E-04
10.0_38645197	10	38 645 197	<i>HSD17B7P2</i>	-6,83	2,20E-05	3,24E-04
10.0_38645216	10	38 645 216	<i>HSD17B7P2</i>	-5,53	4,26E-05	6,28E-04
22.0_23922792	22	23 922 792	<i>IGLL1</i>	5,84	1,88E-03	2,65E-02
15.0_40615387	15	40 615 387	<i>INAFM2</i>	-5,86	1,97E-03	2,76E-02
1.0_209979733	1	209 979 733	<i>IRF6</i>	5,08	1,75E-04	2,56E-03
6.0_168398355	6	168 398 355	<i>KIF25-AS1</i>	6,79	1,35E-04	1,98E-03
1.0_18807301	1	18 807 301	<i>KLHDC7A</i>	7,69	2,18E-03	3,05E-02
17.0_39553960	17	39 553 960	<i>KRT31</i>	6,26	8,62E-04	1,24E-02
1.0_152596031	1	152 596 031	<i>LCE3A</i>	6,95	1,63E-03	2,31E-02
19.0_39303809	19	39 303 809	<i>LGALS4</i>	8,50	1,56E-04	2,29E-03
5.0_77945219	5	77 945 219	<i>LHFPL2</i>	-5,45	3,51E-03	4,80E-02
1.0_226497722	1	226 497 722	<i>LIN9</i>	-8,63	9,97E-05	1,46E-03
13.0_75126494	13	75 126 494	<i>LINC00347</i>	-5,22	1,09E-03	1,56E-02
10.0_89167614	10	89 167 614	<i>LINC00864</i>	-5,59	2,15E-04	3,15E-03
10.0_89167951	10	89 167 951	<i>LINC00864</i>	-5,33	3,85E-04	5,60E-03
10.0_89167971	10	89 167 971	<i>LINC00864</i>	-5,16	1,34E-04	1,96E-03
10.0_89168064	10	89 168 064	<i>LINC00864</i>	-5,04	2,09E-03	2,92E-02
9.0_35860175	9	35 860 175	<i>LINC00950</i>	10,05	2,62E-03	3,64E-02
15.0_95871012	15	95 871 012	<i>LINC01197</i>	-7,13	4,60E-04	6,68E-03
15.0_95871074	15	95 871 074	<i>LINC01197</i>	-5,61	3,23E-03	4,43E-02
20.0_3788931	20	3 788 931	<i>LINC01730</i>	-6,73	1,28E-03	1,83E-02
12.0_65386837	12	65 386 837	<i>LINC02231</i>	8,80	1,92E-04	2,82E-03
17.0_8264282	17	8 264 282	<i>LOC100128288</i>	-8,65	3,62E-03	4,93E-02
13.0_78237191	13	78 237 191	<i>LOC100129307</i>	5,44	2,67E-05	3,94E-04
19.0_49523303	19	49 523 303	<i>LOC101059948</i>	-6,33	1,28E-03	1,83E-02
7.0_56605934	7	56 605 934	<i>LOC101928401</i>	-7,52	1,48E-04	2,18E-03
15.0_67356672	15	67 356 672	<i>LOC102723493</i>	-5,17	1,18E-03	1,68E-02
10.0_2544051	10	2 544 051	<i>LOC105376351</i>	-5,12	1,09E-04	1,60E-03
9.0_44998871	9	44 998 871	<i>LOC105379807</i>	7,01	3,12E-03	4,29E-02
6.0_170571788	6	170 571 788	<i>LOC154449</i>	-5,32	1,77E-04	2,59E-03
8.0_22941656	8	22 941 656	<i>LOC254896</i>	-6,09	3,12E-03	4,29E-02
22.0_20192551	22	20 192 551	<i>LOC284865</i>	6,26	8,23E-04	1,19E-02
17.0_5674571	17	5 674 571	<i>LOC339166</i>	-9,23	2,73E-03	3,78E-02
17.0_5674573	17	5 674 573	<i>LOC339166</i>	-9,34	1,07E-05	1,58E-04
17.0_5674577	17	5 674 577	<i>LOC339166</i>	-8,62	9,78E-04	1,40E-02
17.0_5674592	17	5 674 592	<i>LOC339166</i>	-8,05	2,91E-04	4,24E-03
17.0_5674594	17	5 674 594	<i>LOC339166</i>	-8,76	4,94E-04	7,16E-03
17.0_5674596	17	5 674 596	<i>LOC339166</i>	-8,97	4,89E-05	7,20E-04
17.0_5674599	17	5 674 599	<i>LOC339166</i>	-8,26	2,35E-03	3,27E-02
17.0_5674605	17	5 674 605	<i>LOC339166</i>	-8,44	7,17E-07	1,06E-05
17.0_5674613	17	5 674 613	<i>LOC339166</i>	-8,13	1,75E-04	2,56E-03
17.0_5674622	17	5 674 622	<i>LOC339166</i>	-8,31	1,08E-07	1,61E-06
17.0_5674638	17	5 674 638	<i>LOC339166</i>	-8,78	2,47E-06	3,65E-05
17.0_5674641	17	5 674 641	<i>LOC339166</i>	-8,52	7,49E-06	1,11E-04
17.0_5674648	17	5 674 648	<i>LOC339166</i>	-8,46	1,65E-05	2,43E-04
17.0_5674652	17	5 674 652	<i>LOC339166</i>	-8,47	2,28E-04	3,33E-03
17.0_5674659	17	5 674 659	<i>LOC339166</i>	-8,77	2,61E-04	3,81E-03

11.0_45392662	11	45 392 662	LOC399886	5,48	1,25E-03	1,79E-02
12.0_133187174	12	133 187 174	LRCOL1	-5,57	2,62E-03	3,64E-02
12.0_133187427	12	133 187 427	LRCOL1	-6,69	3,30E-03	4,52E-02
2.0_91848265	2	91 848 265	LSP1P4	-5,23	9,59E-07	1,42E-05
15.0_23893742	15	23 893 742	MAGEL2	7,37	1,20E-03	1,72E-02
6.0_10839441	6	10 839 441	MAK	5,26	1,92E-03	2,70E-02
8.0_98880562	8	98 880 562	MATN2	6,77	1,48E-03	2,10E-02
17.0_8702776	17	8 702 776	MFSD6L	-8,95	7,38E-04	1,06E-02
22.0_18507888	22	18 507 888	MICAL3	-5,75	2,16E-03	3,02E-02
17.0_6559083	17	6 559 083	MIR4520-1	-8,41	3,02E-05	4,45E-04
17.0_6558200	17	6 558 200	MIR4520-2	-9,17	2,40E-06	3,55E-05
17.0_6558413	17	6 558 413	MIR4520-2	-7,08	3,27E-03	4,48E-02
17.0_6558427	17	6 558 427	MIR4520-2	-5,97	3,22E-03	4,41E-02
17.0_6558440	17	6 558 440	MIR4520-2	-6,47	6,95E-04	1,00E-02
17.0_6558578	17	6 558 578	MIR4520-2	-6,60	1,66E-03	2,34E-02
3.0_5292774	3	5 292 774	MIR4790	-6,90	6,83E-04	9,86E-03
15.0_89904169	15	89 904 169	MIR9-3HG	5,10	2,80E-03	3,87E-02
6.0_31691069	6	31 691 069	MPIG6B	-6,15	2,89E-03	3,99E-02
8.0_144655371	8	144 655 371	MROH6	-8,96	5,03E-05	7,41E-04
9.0_21801894	9	21 801 894	MTAP	-8,15	8,58E-05	1,26E-03
1.0_149909433	1	149 909 433	MTMR11	5,50	2,56E-03	3,56E-02
7.0_135662734	7	135 662 734	MTPN	6,14	3,38E-04	4,92E-03
2.0_232395482	2	232 395 482	NMUR1	-6,75	2,42E-03	3,37E-02
1.0_40138513	1	40 138 513	NT5C1A	5,25	5,74E-04	8,32E-03
19.0_33182216	19	33 182 216	NUDT19	6,22	1,31E-03	1,86E-02
13.0_25875266	13	25 875 266	NUP58	-5,72	6,62E-04	9,56E-03
16.0_3405840	16	3 405 840	OR2C1	-5,17	1,05E-04	1,55E-03
19.0_9226505	19	9 226 505	OR7G1	-5,95	3,54E-03	4,83E-02
11.0_59384297	11	59 384 297	OSBP	-5,08	2,71E-03	3,75E-02
9.0_97316955	9	97 316 955	PCAT7	-5,97	3,09E-03	4,25E-02
9.0_97316983	9	97 316 983	PCAT7	-5,58	8,25E-04	1,19E-02
15.0_29034638	15	29 034 638	PDCD6IPP2	-6,48	2,54E-04	3,72E-03
15.0_29034645	15	29 034 645	PDCD6IPP2	-5,45	9,33E-04	1,34E-02
15.0_29034739	15	29 034 739	PDCD6IPP2	-5,00	4,34E-04	6,30E-03
15.0_29034777	15	29 034 777	PDCD6IPP2	-8,63	7,24E-05	1,07E-03
15.0_29034942	15	29 034 942	PDCD6IPP2	-6,32	4,00E-04	5,82E-03
15.0_29034950	15	29 034 950	PDCD6IPP2	-5,46	2,16E-03	3,03E-02
15.0_29034964	15	29 034 964	PDCD6IPP2	-5,90	2,92E-04	4,26E-03
13.0_28493391	13	28 493 391	PDX1	-8,05	2,75E-03	3,80E-02
19.0_2282657	19	2 282 657	PEAK3	-6,03	1,13E-03	1,61E-02
11.0_74110458	11	74 110 458	PGM2L1	-9,01	4,95E-04	7,18E-03
11.0_73356816	11	73 356 816	PLEKHB1	5,63	9,61E-04	1,38E-02
19.0_634320	19	634 320	POLRMT	-5,55	1,26E-03	1,80E-02
16.0_23846838	16	23 846 838	PRKCB	-5,06	3,17E-03	4,36E-02
17.0_1588547	17	1 588 547	PRPF8	-6,45	5,96E-04	8,62E-03
9.0_33750348	9	33 750 348	PRSS3	-5,32	2,38E-03	3,31E-02
11.0_61687835	11	61 687 835	RAB3IL1	5,76	1,28E-03	1,82E-02
13.0_42031034	13	42 031 034	RGCC	-7,40	3,31E-03	4,53E-02
17.0_30592246	17	30 592 246	RHBDL3	-5,29	2,97E-03	4,09E-02



5.0_63461302	5	63 461 302	<i>RNF180</i>	7,03	2,88E-03	3,97E-02
6.0_37321379	6	37 321 379	<i>RNF8</i>	5,55	1,63E-03	2,31E-02
6.0_167276543	6	167 276 543	<i>RPS6KA2</i>	-9,23	1,35E-04	1,98E-03
16.0_66959780	16	66 959 780	<i>RRAD</i>	5,12	2,74E-03	3,79E-02
16.0_21830837	16	21 830 837	<i>RRN3P1</i>	-11,45	2,06E-03	2,89E-02
18.0_67873857	18	67 873 857	<i>RTTN</i>	-8,63	2,30E-03	3,21E-02
1.0_169863954	1	169 863 954	<i>SCYL3</i>	5,10	1,95E-03	2,74E-02
17.0_18267200	17	18 267 200	<i>SHMT1</i>	5,62	6,47E-04	9,35E-03
14.0_58332721	14	58 332 721	<i>SLC35F4</i>	-6,16	2,20E-04	3,22E-03
19.0_51107621	19	51 107 621	<i>SNAR-F</i>	-6,45	1,95E-03	2,74E-02
7.0_127291254	7	127 291 254	<i>SND1</i>	-7,65	2,09E-06	3,09E-05
7.0_127291309	7	127 291 309	<i>SND1</i>	-5,17	1,46E-03	2,08E-02
7.0_127291444	7	127 291 444	<i>SND1</i>	-9,07	3,33E-06	4,93E-05
7.0_127291451	7	127 291 451	<i>SND1</i>	-7,48	2,47E-04	3,61E-03
20.0_62178897	20	62 178 897	<i>SRMS</i>	9,41	3,21E-03	4,41E-02
20.0_31593239	20	31 593 239	<i>SUN5</i>	9,19	1,91E-03	2,68E-02
20.0_58508757	20	58 508 757	<i>SYCP2</i>	-7,12	1,22E-03	1,74E-02
20.0_58508766	20	58 508 766	<i>SYCP2</i>	-5,63	2,16E-03	3,03E-02
16.0_2039025	16	2 039 025	<i>SYNGR3</i>	-5,73	2,82E-03	3,90E-02
6.0_158401967	6	158 401 967	<i>SYNJ2</i>	6,15	2,60E-03	3,60E-02
2.0_159824475	2	159 824 475	<i>TANC1</i>	-7,46	1,82E-03	2,57E-02
7.0_72993657	7	72 993 657	<i>TBL2</i>	11,35	1,12E-03	1,60E-02
20.0_591907	20	591 907	<i>TCF15</i>	-5,18	3,31E-04	4,83E-03
19.0_5568216	19	5 568 216	<i>TINCR</i>	-5,56	1,06E-03	1,51E-02
1.0_9648434	1	9 648 434	<i>TMEM201</i>	-6,18	1,57E-03	2,22E-02
7.0_123674032	7	123 674 032	<i>TMEM229A</i>	5,23	5,56E-04	8,06E-03
6.0_157746209	6	157 746 209	<i>TMEM242</i>	-6,16	6,23E-05	9,17E-04
8.0_91659078	8	91 659 078	<i>TMEM64</i>	-9,90	3,00E-03	4,14E-02
9.0_100263069	9	100 263 069	<i>TMOD1</i>	-5,18	1,85E-03	2,60E-02
22.0_38092858	22	38 092 858	<i>TRIOBP</i>	-5,56	3,15E-03	4,33E-02
5.0_892035	5	892 035	<i>TRIP13</i>	-5,14	2,19E-04	3,20E-03
5.0_34838759	5	34 838 759	<i>TTC23L</i>	6,15	4,79E-06	7,08E-05
21.0_38640902	21	38 640 902	<i>VPS26C</i>	-7,61	9,63E-04	1,38E-02
5.0_135416331	5	135 416 331	<i>VTRNA2-1</i>	5,03	2,41E-03	3,35E-02
5.0_135416370	5	135 416 370	<i>VTRNA2-1</i>	6,79	2,69E-04	3,92E-03
2.0_24270726	2	24 270 726	<i>WDCP</i>	-5,87	9,55E-04	1,37E-02
2.0_128569347	2	128 569 347	<i>WDR33</i>	-5,51	3,18E-03	4,37E-02
16.0_680340	16	680 340	<i>WFIKKN1</i>	-5,56	3,28E-03	4,49E-02
6.0_28584121	6	28 584 121	<i>ZBED9</i>	-8,31	2,28E-03	3,19E-02
19.0_58962425	19	58 962 425	<i>ZNF324B</i>	-6,02	5,16E-04	7,48E-03
19.0_53361367	19	53 361 367	<i>ZNF468</i>	-5,14	2,74E-03	3,79E-02
19.0_36737271	19	36 737 271	<i>ZNF565</i>	-6,81	2,47E-05	3,64E-04
19.0_53239261	19	53 239 261	<i>ZNF611</i>	-5,97	5,46E-04	7,91E-03
8.0_7783649	8	7 783 649	<i>ZNF705B</i>	-7,20	9,35E-05	1,37E-03
19.0_21264896	19	21 264 896	<i>ZNF714</i>	-5,24	2,04E-05	3,01E-04
19.0_21264930	19	21 264 930	<i>ZNF714</i>	-5,01	5,84E-04	8,46E-03
19.0_21264933	19	21 264 933	<i>ZNF714</i>	-5,13	2,57E-04	3,76E-03

## Annexe II

Le tableau suivant regroupe tous les résultats de méthylation significatifs ( $FDR \leq 0,05$ ) pour les CpG situés dans les promoteurs des gènes et dont la valeur de  $\Delta\text{-meth} \geq 5\%$  pour le phénotype asthme allergique. Ce tableau a été mis en annexe dans le but d'alléger la section résultats du présent document.

CpG	Chr	Position	Gène	$\Delta\text{-meth}$ (%)	P-value	FDR
4.0_171011673	4	171 011 673	AADAT	-5,24	2,80E-03	3,94E-02
5.0_148520854	5	148 520 854	ABLIM3	-6,67	3,39E-03	4,72E-02
17.0_1133546	17	1 133 546	ABR	-6,51	4,77E-04	7,03E-03
2.0_237477610	2	237 477 610	ACKR3	-6,10	1,86E-03	2,66E-02
12.0_43945832	12	43 945 832	ADAMTS20	-6,43	3,06E-03	4,29E-02
7.0_45613417	7	45 613 417	ADCY1	-6,04	1,11E-03	1,61E-02
10.0_134900733	10	134 900 733	ADGRA1-AS1	-8,61	2,73E-03	3,85E-02
10.0_134900747	10	134 900 747	ADGRA1-AS1	-9,52	6,05E-04	8,89E-03
1.0_203096048	1	203 096 048	ADORA1	7,88	5,34E-05	7,99E-04
13.0_114108515	13	114 108 515	ADPRHL1	6,74	9,45E-04	1,38E-02
5.0_159343032	5	159 343 032	ADRA1B	6,90	3,54E-03	4,93E-02
1.0_50489845	1	50 489 845	AGBL4	-5,50	4,34E-04	6,40E-03
1.0_65612763	1	65 612 763	AK4	7,63	8,95E-05	1,33E-03
14.0_105262494	14	105 262 494	AKT1	9,88	2,25E-04	3,34E-03
11.0_67775972	11	67 775 972	ALDH3B1	5,30	5,03E-04	7,40E-03
21.0_15352801	21	15 352 801	ANKRD20A11P	-9,22	2,95E-03	4,14E-02
21.0_15352804	21	15 352 804	ANKRD20A11P	-10,71	4,45E-04	6,56E-03
21.0_15352820	21	15 352 820	ANKRD20A11P	-9,71	2,98E-03	4,19E-02
21.0_15352828	21	15 352 828	ANKRD20A11P	-10,00	3,02E-03	4,24E-02
21.0_15352851	21	15 352 851	ANKRD20A11P	-8,01	1,44E-03	2,08E-02
21.0_15352957	21	15 352 957	ANKRD20A11P	-6,02	4,83E-04	7,12E-03
21.0_15353027	21	15 353 027	ANKRD20A11P	-6,99	7,39E-04	1,08E-02
21.0_15353030	21	15 353 030	ANKRD20A11P	-9,97	2,51E-03	3,55E-02
21.0_15353133	21	15 353 133	ANKRD20A11P	-13,93	1,63E-03	2,35E-02
21.0_15353304	21	15 353 304	ANKRD20A11P	-13,28	6,71E-04	9,84E-03
18.0_14748068	18	14 748 068	ANKRD30B	-6,96	2,50E-03	3,54E-02
11.0_925427	11	925 427	AP2A2	7,54	3,21E-03	4,49E-02
11.0_925480	11	925 480	AP2A2	7,92	1,89E-03	2,70E-02
5.0_72921399	5	72 921 399	ARHGEF28	-5,12	2,01E-03	2,87E-02
11.0_2293074	11	2 293 074	ASCL2	7,16	5,37E-05	8,02E-04
8.0_47529334	8	47 529 334	ASNSP1	-11,12	2,61E-03	3,69E-02
12.0_568644	12	568 644	B4GALNT3	-6,27	2,00E-03	2,85E-02
7.0_107220155	7	107 220 155	BCAP29	-5,51	1,13E-04	1,69E-03
11.0_27744326	11	27 744 326	BDNF	-6,16	6,81E-04	9,98E-03
20.0_61867137	20	61 867 137	BIRC7	-5,43	6,99E-04	1,02E-02
9.0_67340175	9	67 340 175	BMS1P14	-5,79	1,49E-05	2,24E-04
20.0_31781040	20	31 781 040	BPIFA4P	6,11	4,35E-05	6,50E-04
15.0_38988533	15	38 988 533	C15orf53	5,11	7,54E-04	1,10E-02
1.0_151810216	1	151 810 216	C2CD4D-AS1	10,47	1,46E-03	2,11E-02
2.0_132560172	2	132 560 172	C2orf27B	-5,70	1,15E-03	1,66E-02

2.0_132560175	2	132 560 175	<i>C2orf27B</i>	-6,12	1,73E-08	2,60E-07
2.0_132560203	2	132 560 203	<i>C2orf27B</i>	-7,01	1,41E-10	2,13E-09
2.0_132560222	2	132 560 222	<i>C2orf27B</i>	-6,44	3,41E-05	5,10E-04
5.0_23951416	5	23 951 416	<i>C5orf17</i>	-5,51	2,86E-07	4,30E-06
5.0_23951418	5	23 951 418	<i>C5orf17</i>	-5,73	3,88E-09	5,85E-08
5.0_23951421	5	23 951 421	<i>C5orf17</i>	-5,16	3,05E-11	4,60E-10
8.0_144120563	8	144 120 563	<i>C8orf31</i>	-5,53	3,33E-06	5,00E-05
9.0_95857577	9	95 857 577	<i>CARD19</i>	15,89	3,02E-03	4,23E-02
7.0_116139180	7	116 139 180	<i>CAV2</i>	6,83	9,59E-04	1,40E-02
7.0_116139280	7	116 139 280	<i>CAV2</i>	6,54	2,80E-05	4,19E-04
18.0_57365327	18	57 365 327	<i>CCBE1</i>	-5,54	2,95E-03	4,15E-02
17.0_16593613	17	16 593 613	<i>CCDC144A</i>	-5,28	5,55E-04	8,16E-03
18.0_52626766	18	52 626 766	<i>CCDC68</i>	-6,13	2,81E-04	4,16E-03
1.0_86045788	1	86 045 788	<i>CCN1</i>	5,42	1,52E-03	2,20E-02
11.0_66084534	11	66 084 534	<i>CD248</i>	-10,76	3,07E-04	4,54E-03
2.0_87036139	2	87 036 139	<i>CD8A</i>	10,42	6,88E-04	1,01E-02
16.0_68677997	16	68 677 997	<i>CDH3</i>	5,09	3,26E-04	4,82E-03
22.0_46647061	22	46 647 061	<i>CDPF1</i>	8,07	9,42E-04	1,37E-02
22.0_46647089	22	46 647 089	<i>CDPF1</i>	7,07	3,23E-03	4,52E-02
22.0_46647117	22	46 647 117	<i>CDPF1</i>	10,90	7,05E-04	1,03E-02
4.0_68411812	4	68 411 812	<i>CENPC</i>	-6,35	9,26E-04	1,35E-02
1.0_214776012	1	214 776 012	<i>CENPF</i>	7,09	8,66E-04	1,26E-02
15.0_49104138	15	49 104 138	<i>CEP152</i>	5,87	2,85E-03	4,01E-02
19.0_49534361	19	49 534 361	<i>CGB2</i>	-5,71	6,58E-06	9,88E-05
21.0_37757146	21	37 757 146	<i>CHAF1B</i>	6,73	1,00E-06	1,51E-05
11.0_67889641	11	67 889 641	<i>CHKA</i>	9,27	1,88E-07	2,83E-06
14.0_103989865	14	103 989 865	<i>CKB</i>	-12,97	1,43E-05	2,14E-04
8.0_62200432	8	62 200 432	<i>CLVS1</i>	-8,54	1,64E-08	2,47E-07
13.0_100258074	13	100 258 074	<i>CLYBL</i>	7,70	6,30E-06	9,45E-05
7.0_155326923	7	155 326 923	<i>CNPY1</i>	-5,52	1,36E-04	2,02E-03
1.0_167523769	1	167 523 769	<i>CREG1</i>	-5,46	1,58E-03	2,28E-02
22.0_25843113	22	25 843 113	<i>CRYBB2P1</i>	-16,18	2,26E-03	3,21E-02
7.0_151138350	7	151 138 350	<i>CRYGN</i>	5,99	1,95E-03	2,79E-02
7.0_151138516	7	151 138 516	<i>CRYGN</i>	6,78	8,27E-05	1,23E-03
7.0_151138528	7	151 138 528	<i>CRYGN</i>	11,48	5,45E-04	8,02E-03
7.0_151138548	7	151 138 548	<i>CRYGN</i>	7,68	5,44E-04	8,01E-03
13.0_21100898	13	21 100 898	<i>CRYL1</i>	9,13	1,12E-04	1,68E-03
16.0_50775301	16	50 775 301	<i>CYLD</i>	10,40	3,21E-04	4,75E-03
19.0_16045708	19	16 045 708	<i>CYP4F11</i>	-8,52	1,75E-05	2,62E-04
19.0_14530637	19	14 530 637	<i>DDX39A</i>	-7,27	2,92E-03	4,10E-02
6.0_30641514	6	30 641 514	<i>DHX16</i>	-6,11	3,29E-03	4,59E-02
5.0_138775455	5	138 775 455	<i>DNAJC18</i>	5,90	8,98E-04	1,31E-02
10.0_98063967	10	98 063 967	<i>DNTT</i>	6,55	2,64E-03	3,73E-02
21.0_38737463	21	38 737 463	<i>DYRK1A</i>	-7,80	1,41E-04	2,10E-03
13.0_50265991	13	50 265 991	<i>EBPL</i>	5,34	1,35E-03	1,95E-02
5.0_38257888	5	38 257 888	<i>EGFLAM</i>	-5,99	2,53E-03	3,57E-02
18.0_713025	18	713 025	<i>ENOSF1</i>	-6,30	1,10E-03	1,60E-02
1.0_150602860	1	150 602 860	<i>ENSA</i>	6,84	2,96E-03	4,16E-02
2.0_47572489	2	47 572 489	<i>EPCAM-DT</i>	6,26	1,91E-03	2,74E-02

6.0_94130034	6	94 130 034	<i>EPHA7</i>	-12,65	5,95E-04	8,75E-03
19.0_55586676	19	55 586 676	<i>EPS8L1</i>	8,26	1,26E-04	1,88E-03
8.0_681981	8	681 981	<i>ERICH1</i>	-7,08	2,29E-03	3,25E-02
8.0_682082	8	682 082	<i>ERICH1</i>	7,94	1,28E-04	1,90E-03
14.0_76837483	14	76 837 483	<i>ESRRB</i>	5,04	8,78E-05	1,31E-03
6.0_133561647	6	133 561 647	<i>EYA4</i>	-5,28	1,15E-03	1,67E-02
9.0_35564121	9	35 564 121	<i>FAM166B</i>	-8,31	3,58E-05	5,36E-04
12.0_8380891	12	8 380 891	<i>FAM90A1</i>	-5,33	3,94E-04	5,82E-03
15.0_91427363	15	91 427 363	<i>FES</i>	-15,00	2,30E-08	3,46E-07
2.0_113402354	2	113 402 354	<i>FLJ42351</i>	7,28	3,76E-07	5,66E-06
15.0_33487558	15	33 487 558	<i>FMN1</i>	-6,38	7,89E-06	1,18E-04
15.0_33487631	15	33 487 631	<i>FMN1</i>	-8,65	2,94E-04	4,35E-03
15.0_33487656	15	33 487 656	<i>FMN1</i>	-5,81	4,39E-06	6,60E-05
16.0_15983123	16	15 983 123	<i>FOPNL</i>	5,82	8,38E-04	1,22E-02
17.0_79495348	17	79 495 348	<i>FSCN2</i>	-5,39	3,12E-03	4,37E-02
1.0_24195469	1	24 195 469	<i>FUCA1</i>	6,01	7,87E-04	1,15E-02
4.0_46126245	4	46 126 245	<i>GABRG1</i>	-6,04	1,44E-03	2,08E-02
10.0_85898610	10	85 898 610	<i>GHITM</i>	6,98	3,90E-04	5,76E-03
12.0_56882586	12	56 882 586	<i>GLS2</i>	-7,56	2,14E-03	3,04E-02
12.0_56882588	12	56 882 588	<i>GLS2</i>	-7,17	1,13E-04	1,68E-03
1.0_235814566	1	235 814 566	<i>GNG4</i>	-9,65	1,96E-03	2,80E-02
10.0_125425236	10	125 425 236	<i>GPR26</i>	-8,21	1,16E-04	1,72E-03
11.0_94135016	11	94 135 016	<i>GPR83</i>	-8,44	1,45E-03	2,09E-02
9.0_140033475	9	140 033 475	<i>GRIN1</i>	-9,77	2,16E-03	3,07E-02
13.0_114321481	13	114 321 481	<i>GRK1</i>	-5,52	8,34E-04	1,22E-02
5.0_178423210	5	178 423 210	<i>GRM6</i>	6,09	6,11E-04	8,98E-03
1.0_110254692	1	110 254 692	<i>GSTM5</i>	-9,25	1,02E-04	1,52E-03
1.0_110254709	1	110 254 709	<i>GSTM5</i>	-6,84	8,46E-10	1,27E-08
1.0_110254720	1	110 254 720	<i>GSTM5</i>	-7,21	6,02E-09	9,06E-08
7.0_75738294	7	75 738 294	<i>GTF2IP7</i>	6,31	4,94E-09	7,43E-08
7.0_57248045	7	57 248 045	<i>GUSBP10</i>	5,69	2,97E-13	4,48E-12
5.0_83017030	5	83 017 030	<i>HAPLN1</i>	7,10	2,45E-05	3,67E-04
6.0_26204319	6	26 204 319	<i>HIST1H4E</i>	-7,61	7,05E-09	1,06E-07
2.0_38831111	2	38 831 111	<i>HNRNPLL</i>	9,88	1,61E-06	2,41E-05
2.0_38831147	2	38 831 147	<i>HNRNPLL</i>	9,48	1,43E-03	2,07E-02
5.0_118787508	5	118 787 508	<i>HSD17B4</i>	-7,20	2,52E-03	3,57E-02
10.0_38645113	10	38 645 113	<i>HSD17B7P2</i>	-7,07	4,72E-04	6,95E-03
10.0_38645121	10	38 645 121	<i>HSD17B7P2</i>	-8,28	7,65E-04	1,12E-02
10.0_38645126	10	38 645 126	<i>HSD17B7P2</i>	-7,30	1,06E-03	1,54E-02
10.0_38645148	10	38 645 148	<i>HSD17B7P2</i>	-9,18	8,71E-04	1,27E-02
10.0_38645157	10	38 645 157	<i>HSD17B7P2</i>	-8,32	5,48E-05	8,19E-04
10.0_38645162	10	38 645 162	<i>HSD17B7P2</i>	-5,45	5,62E-04	8,26E-03
10.0_38645170	10	38 645 170	<i>HSD17B7P2</i>	-9,56	1,03E-03	1,49E-02
10.0_38645177	10	38 645 177	<i>HSD17B7P2</i>	-6,14	1,20E-03	1,74E-02
10.0_38645191	10	38 645 191	<i>HSD17B7P2</i>	-7,17	1,22E-04	1,81E-03
10.0_38645197	10	38 645 197	<i>HSD17B7P2</i>	-8,94	3,21E-03	4,49E-02
10.0_38645203	10	38 645 203	<i>HSD17B7P2</i>	-5,99	1,02E-03	1,49E-02
10.0_38645216	10	38 645 216	<i>HSD17B7P2</i>	-7,65	1,67E-06	2,50E-05
10.0_38645283	10	38 645 283	<i>HSD17B7P2</i>	-5,07	5,44E-11	8,19E-10

22.0_23922792	22	23 922 792	<i>IGLL1</i>	9,81	1,13E-15	1,70E-14
22.0_17565102	22	17 565 102	<i>IL17RA</i>	5,10	5,71E-13	8,61E-12
10.0_105036192	10	105 036 192	<i>INA</i>	-6,66	2,05E-04	3,04E-03
5.0_3595984	5	3 595 984	<i>IRX1</i>	-7,07	4,17E-04	6,15E-03
9.0_469777	9	469 777	<i>KANK1</i>	5,27	5,69E-04	8,37E-03
11.0_108369970	11	108 369 970	<i>KDELC2</i>	-8,52	2,61E-03	3,68E-02
17.0_39553960	17	39 553 960	<i>KRT31</i>	8,79	2,81E-03	3,95E-02
17.0_39526726	17	39 526 726	<i>KRT33B</i>	-6,41	3,05E-04	4,51E-03
1.0_152596031	1	152 596 031	<i>LCE3A</i>	9,13	2,17E-03	3,09E-02
11.0_18477360	11	18 477 360	<i>LDHAL6A</i>	-7,59	3,56E-04	5,27E-03
16.0_75150744	16	75 150 744	<i>LDHD</i>	6,11	1,29E-04	1,91E-03
1.0_226497722	1	226 497 722	<i>LIN9</i>	-12,25	2,58E-04	3,83E-03
10.0_1205314	10	1 205 314	<i>LINC00200</i>	6,12	3,20E-03	4,47E-02
2.0_232379626	2	232 379 626	<i>LINC00471</i>	-6,71	5,45E-04	8,02E-03
17.0_12453073	17	12 453 073	<i>LINC00670</i>	5,01	3,22E-04	4,77E-03
9.0_132250065	9	132 250 065	<i>LINC00963</i>	5,39	8,18E-04	1,20E-02
2.0_864114	2	864 114	<i>LINC01115</i>	5,28	8,93E-05	1,33E-03
2.0_864518	2	864 518	<i>LINC01115</i>	7,79	4,06E-05	6,07E-04
2.0_864826	2	864 826	<i>LINC01115</i>	5,31	8,23E-04	1,20E-02
2.0_864838	2	864 838	<i>LINC01115</i>	5,01	3,16E-03	4,42E-02
2.0_864844	2	864 844	<i>LINC01115</i>	5,46	1,25E-03	1,81E-02
2.0_864846	2	864 846	<i>LINC01115</i>	7,52	1,68E-03	2,41E-02
2.0_864890	2	864 890	<i>LINC01115</i>	5,90	2,22E-03	3,16E-02
15.0_95871074	15	95 871 074	<i>LINC01197</i>	-6,30	9,17E-04	1,34E-02
2.0_242823272	2	242 823 272	<i>LINC01237</i>	-9,78	1,61E-03	2,32E-02
12.0_11699993	12	11 699 993	<i>LINC01252</i>	5,48	8,86E-04	1,29E-02
12.0_11700058	12	11 700 058	<i>LINC01252</i>	7,99	1,64E-03	2,36E-02
12.0_11700085	12	11 700 085	<i>LINC01252</i>	7,38	2,44E-03	3,46E-02
12.0_11700091	12	11 700 091	<i>LINC01252</i>	5,31	3,38E-03	4,72E-02
12.0_11700094	12	11 700 094	<i>LINC01252</i>	8,05	8,80E-04	1,29E-02
12.0_11700150	12	11 700 150	<i>LINC01252</i>	6,43	4,75E-04	6,99E-03
12.0_11700233	12	11 700 233	<i>LINC01252</i>	10,57	1,05E-03	1,53E-02
12.0_11700235	12	11 700 235	<i>LINC01252</i>	8,00	1,86E-03	2,67E-02
12.0_11700239	12	11 700 239	<i>LINC01252</i>	9,40	2,81E-04	4,17E-03
12.0_11700254	12	11 700 254	<i>LINC01252</i>	7,35	1,52E-06	2,28E-05
12.0_11700275	12	11 700 275	<i>LINC01252</i>	6,27	3,83E-07	5,77E-06
12.0_11700277	12	11 700 277	<i>LINC01252</i>	6,69	5,68E-06	8,52E-05
12.0_11700284	12	11 700 284	<i>LINC01252</i>	7,65	2,94E-07	4,43E-06
12.0_11700303	12	11 700 303	<i>LINC01252</i>	8,86	2,81E-13	4,23E-12
12.0_11700321	12	11 700 321	<i>LINC01252</i>	6,79	1,83E-05	2,73E-04
12.0_11700395	12	11 700 395	<i>LINC01252</i>	7,23	1,69E-07	2,54E-06
12.0_11700431	12	11 700 431	<i>LINC01252</i>	5,66	4,11E-07	6,18E-06
12.0_11700489	12	11 700 489	<i>LINC01252</i>	5,33	2,99E-05	4,48E-04
12.0_11700500	12	11 700 500	<i>LINC01252</i>	6,33	6,00E-07	9,02E-06
12.0_11700507	12	11 700 507	<i>LINC01252</i>	7,62	6,03E-04	8,87E-03
12.0_11700522	12	11 700 522	<i>LINC01252</i>	8,21	1,02E-04	1,53E-03
12.0_11700524	12	11 700 524	<i>LINC01252</i>	5,00	2,89E-05	4,32E-04
12.0_11700540	12	11 700 540	<i>LINC01252</i>	7,69	2,30E-03	3,27E-02
12.0_11700572	12	11 700 572	<i>LINC01252</i>	5,04	3,57E-03	4,96E-02

12.0_11700608	12	11 700 608	LINC01252	6,99	1,19E-03	1,73E-02
1.0_11669062	1	11 669 062	LINC01647	5,02	8,09E-04	1,18E-02
21.0_47012613	21	47 012 613	LINC01694	-12,37	1,23E-04	1,84E-03
20.0_3788931	20	3 788 931	LINC01730	-9,07	1,18E-04	1,76E-03
2.0_46621968	2	46 621 968	LINC01820	5,09	2,35E-03	3,34E-02
2.0_105759884	2	105 759 884	LINC01918	5,96	5,06E-05	7,57E-04
2.0_11018021	2	11 018 021	LINC01954	7,60	2,35E-03	3,34E-02
12.0_10096794	12	10 096 794	LINC02470	-5,71	2,47E-03	3,50E-02
4.0_31998152	4	31 998 152	LINC02506	-5,61	2,33E-03	3,31E-02
4.0_31998160	4	31 998 160	LINC02506	-5,60	3,84E-04	5,67E-03
4.0_31998166	4	31 998 166	LINC02506	-5,65	1,75E-03	2,51E-02
4.0_31998227	4	31 998 227	LINC02506	-7,20	2,82E-04	4,18E-03
4.0_31998246	4	31 998 246	LINC02506	-6,36	1,45E-04	2,15E-03
4.0_31998261	4	31 998 261	LINC02506	-5,82	1,97E-03	2,81E-02
4.0_31998314	4	31 998 314	LINC02506	-7,34	2,92E-03	4,11E-02
6.0_168079944	6	168 079 944	LINC02538	-8,72	2,16E-03	3,07E-02
11.0_8290476	11	8 290 476	LMO1	5,09	2,76E-03	3,89E-02
13.0_78237191	13	78 237 191	LOC100129307	6,87	4,94E-04	7,27E-03
7.0_56950176	7	56 950 176	LOC100130849	-6,84	1,90E-04	2,82E-03
6.0_27729302	6	27 729 302	LOC100131289	9,33	1,96E-03	2,80E-02
6.0_32861623	6	32 861 623	LOC100294145	6,91	2,50E-03	3,53E-02
19.0_38346071	19	38 346 071	LOC100631378	6,76	1,59E-03	2,29E-02
16.0_1478669	16	1 478 669	LOC105371045	6,56	2,99E-03	4,19E-02
20.0_25731089	20	25 731 089	LOC105372582	5,12	1,19E-03	1,73E-02
6.0_170571788	6	170 571 788	LOC154449	-6,43	3,23E-03	4,52E-02
21.0_40310602	21	40 310 602	LOC400867	-8,27	8,00E-05	1,19E-03
21.0_40310618	21	40 310 618	LOC400867	-9,85	8,15E-05	1,22E-03
21.0_40310654	21	40 310 654	LOC400867	-8,31	7,85E-04	1,15E-02
7.0_56516243	7	56 516 243	LOC650226	-6,98	2,92E-04	4,32E-03
5.0_1635059	5	1 635 059	LOC728613	-7,60	7,14E-11	1,08E-09
8.0_12613847	8	12 613 847	LONRF1	-7,32	1,19E-07	1,78E-06
2.0_91847980	2	91 847 980	LSP1P4	-7,25	5,02E-05	7,50E-04
2.0_91848000	2	91 848 000	LSP1P4	-5,25	1,51E-06	2,27E-05
2.0_91848025	2	91 848 025	LSP1P4	-6,88	9,42E-08	1,42E-06
2.0_91848029	2	91 848 029	LSP1P4	-6,31	3,20E-12	4,82E-11
2.0_91848050	2	91 848 050	LSP1P4	-6,04	3,05E-10	4,60E-09
2.0_91848260	2	91 848 260	LSP1P4	-6,05	3,70E-12	5,58E-11
2.0_91848265	2	91 848 265	LSP1P4	-5,78	1,08E-22	1,63E-21
15.0_23893742	15	23 893 742	MAGEL2	8,38	3,31E-17	5,00E-16
19.0_49223662	19	49 223 662	MAMSTR	11,43	1,45E-18	2,18E-17
6.0_84141234	6	84 141 234	ME1	-6,19	4,71E-21	7,10E-20
17.0_4634115	17	4 634 115	MED11	6,97	3,36E-28	5,07E-27
17.0_4634124	17	4 634 124	MED11	7,20	3,35E-20	5,05E-19
17.0_42733698	17	42 733 698	MEIOC	5,11	6,22E-20	9,37E-19
17.0_8702782	17	8 702 782	MFSD6L	-9,37	6,17E-12	9,29E-11
10.0_15902692	10	15 902 692	MINDY3	-5,36	2,85E-12	4,30E-11
11.0_57407842	11	57 407 842	MIR130A	5,61	9,54E-15	1,44E-13
21.0_26933982	21	26 933 982	MIR155HG	5,14	2,81E-20	4,24E-19
17.0_6558200	17	6 558 200	MIR4520-2	-10,95	1,12E-14	1,69E-13

3.0_5292774	3	5 292 774	MIR4790	-10,48	1,59E-09	2,39E-08
8.0_1764467	8	1 764 467	MIR596	7,47	4,01E-15	6,04E-14
20.0_58713481	20	58 713 481	MIR646HG	-5,34	3,55E-04	5,26E-03
13.0_49794075	13	49 794 075	MLNR	5,45	6,34E-08	9,54E-07
16.0_58058518	16	58 058 518	MMP15	5,60	1,85E-03	2,65E-02
16.0_55512521	16	55 512 521	MMP2	7,97	2,80E-03	3,94E-02
17.0_41911140	17	41 911 140	MPP3	5,60	3,39E-03	4,73E-02
19.0_13874993	19	13 874 993	MRI1	-6,96	1,48E-03	2,14E-02
19.0_13875014	19	13 875 014	MRI1	-5,21	2,39E-03	3,40E-02
19.0_13875045	19	13 875 045	MRI1	-9,85	1,17E-03	1,70E-02
19.0_13875053	19	13 875 053	MRI1	-9,21	7,70E-04	1,13E-02
19.0_13875063	19	13 875 063	MRI1	-10,63	1,70E-03	2,44E-02
19.0_13875067	19	13 875 067	MRI1	-9,83	9,96E-06	1,49E-04
19.0_13875083	19	13 875 083	MRI1	-7,34	6,64E-04	9,73E-03
19.0_13875096	19	13 875 096	MRI1	-8,45	2,23E-03	3,17E-02
19.0_13875102	19	13 875 102	MRI1	-6,38	6,09E-04	8,95E-03
19.0_13875111	19	13 875 111	MRI1	-7,31	1,67E-04	2,49E-03
19.0_13875113	19	13 875 113	MRI1	-6,77	2,45E-03	3,47E-02
19.0_13875126	19	13 875 126	MRI1	-5,68	1,68E-03	2,41E-02
19.0_13875135	19	13 875 135	MRI1	-6,71	3,08E-03	4,32E-02
9.0_21802008	9	21 802 008	MTAP	-6,91	2,12E-03	3,02E-02
7.0_135662734	7	135 662 734	MTPN	9,45	2,60E-03	3,67E-02
7.0_30173809	7	30 173 809	MTURN	-6,14	1,81E-04	2,69E-03
7.0_30174039	7	30 174 039	MTURN	-5,81	1,66E-03	2,39E-02
11.0_1036727	11	1 036 727	MUC6	5,90	2,68E-03	3,79E-02
17.0_48585398	17	48 585 398	MYCBPAP	7,10	2,92E-03	4,10E-02
11.0_76838726	11	76 838 726	MYO7A	5,30	3,55E-03	4,94E-02
11.0_61519778	11	61 519 778	MYRF	10,14	3,12E-03	4,37E-02
5.0_138725705	5	138 725 705	MZB1	7,95	1,29E-03	1,87E-02
14.0_57856465	14	57 856 465	NAA30	-7,82	1,30E-03	1,88E-02
11.0_89867385	11	89 867 385	NAALAD2	-5,87	7,18E-04	1,05E-02
11.0_34126398	11	34 126 398	NAT10	-5,78	1,76E-03	2,53E-02
1.0_54304531	1	54 304 531	NDC1	-7,51	1,01E-04	1,50E-03
15.0_23932464	15	23 932 464	NDN	-6,05	1,44E-04	2,14E-03
15.0_23932758	15	23 932 758	NDN	6,20	2,20E-04	3,27E-03
11.0_77791953	11	77 791 953	NDUFC2-			
7.0_26190986	7	26 190 986	KCTD14	-5,22	3,29E-03	4,59E-02
4.0_1400244	4	1 400 244	NFE2L3	9,46	5,98E-04	8,78E-03
2.0_232395482	2	232 395 482	NKX1-1	-5,42	1,34E-03	1,93E-02
1.0_11908298	1	11 908 298	NMUR1	-7,68	2,54E-03	3,59E-02
12.0_100866767	12	100 866 767	NPPA	-6,59	2,29E-03	3,26E-02
17.0_28443445	17	28 443 445	NR1H4	5,29	1,61E-04	2,40E-03
10.0_74869556	10	74 869 556	NSRP1	-10,74	3,36E-03	4,68E-02
19.0_33182216	19	33 182 216	NUDT13	-5,35	1,83E-03	2,62E-02
18.0_56702750	18	56 702 750	NUDT19	5,79	1,33E-03	1,93E-02
			OACYLP	6,50	3,65E-04	5,39E-03
			P2RX5-			
17.0_3600390	17	3 600 390	TAX1BP3	-8,51	1,24E-03	1,80E-02
20.0_21685472	20	21 685 472	PAX1	-5,49	2,37E-03	3,36E-02

5.0_131593161	5	131 593 161	<i>PDLIM4</i>	7,23	8,51E-04	1,24E-02
16.0_81254265	16	81 254 265	<i>PKD1L2</i>	5,56	1,40E-03	2,02E-02
19.0_292018	19	292 018	<i>PLPP2</i>	-6,27	2,18E-04	3,24E-03
14.0_39643564	14	39 643 564	<i>PNN</i>	-6,16	2,44E-03	3,45E-02
19.0_43710277	19	43 710 277	<i>PSG4</i>	8,64	2,10E-04	3,12E-03
1.0_151226910	1	151 226 910	<i>PSMD4</i>	-5,87	1,77E-03	2,54E-02
1.0_151226929	1	151 226 929	<i>PSMD4</i>	-8,77	3,00E-03	4,21E-02
1.0_151226935	1	151 226 935	<i>PSMD4</i>	-5,63	8,81E-04	1,29E-02
15.0_55881227	15	55 881 227	<i>PYGO1</i>	7,45	1,26E-03	1,82E-02
15.0_38857451	15	38 857 451	<i>RASGRP1</i>	10,13	3,36E-04	4,98E-03
17.0_34057687	17	34 057 687	<i>RASL10B</i>	7,73	2,41E-03	3,42E-02
20.0_387927	20	387 927	<i>RBCK1</i>	-8,22	2,41E-03	3,41E-02
2.0_86566099	2	86 566 099	<i>REEP1</i>	6,53	8,55E-05	1,28E-03
3.0_16555683	3	16 555 683	<i>RFTN1</i>	-9,51	1,40E-03	2,02E-02
17.0_30592246	17	30 592 246	<i>RHBDL3</i>	-7,99	3,01E-03	4,22E-02
12.0_131201838	12	131 201 838	<i>RIMBP2</i>	6,38	2,92E-03	4,10E-02
12.0_49259997	12	49 259 997	<i>RND1</i>	5,48	1,39E-03	2,01E-02
6.0_37321379	6	37 321 379	<i>RNF8</i>	6,66	1,15E-04	1,71E-03
11.0_507766	11	507 766	<i>RNH1</i>	-5,02	1,27E-03	1,84E-02
15.0_61522179	15	61 522 179	<i>RORA</i>	7,13	3,15E-03	4,40E-02
5.0_40835815	5	40 835 815	<i>RPL37</i>	5,93	9,61E-05	1,43E-03
1.0_150335960	1	150 335 960	<i>RPRD2</i>	-6,74	3,35E-03	4,67E-02
19.0_46000808	19	46 000 808	<i>RTN2</i>	7,06	3,03E-03	4,25E-02
1.0_153586108	1	153 586 108	<i>S100A16</i>	6,82	2,55E-03	3,61E-02
20.0_35580436	20	35 580 436	<i>SAMHD1</i>	-5,30	3,34E-03	4,66E-02
22.0_43740093	22	43 740 093	<i>SCUBE1</i>	8,31	2,43E-03	3,45E-02
16.0_82045282	16	82 045 282	<i>SDR42E1</i>	5,95	3,22E-04	4,77E-03
7.0_100769535	7	100 769 535	<i>SERPINE1</i>	-9,45	2,55E-04	3,79E-03
16.0_30968035	16	30 968 035	<i>SETD1A</i>	-5,18	4,73E-15	7,13E-14
10.0_105616094	10	105 616 094	<i>SH3PXD2A</i>	6,43	8,32E-16	1,25E-14
14.0_60975044	14	60 975 044	<i>SIX6</i>	6,74	1,64E-17	2,48E-16
11.0_22359230	11	22 359 230	<i>SLC17A6</i>	-5,08	5,95E-17	8,96E-16
17.0_33760316	17	33 760 316	<i>SLFN12</i>	6,10	3,00E-06	4,50E-05
20.0_48883976	20	48 883 976	<i>SMIM25</i>	8,77	1,46E-03	2,10E-02
7.0_127291254	7	127 291 254	<i>SND1</i>	-6,93	2,45E-03	3,47E-02
7.0_127291444	7	127 291 444	<i>SND1</i>	-10,25	5,18E-04	7,62E-03
7.0_127291451	7	127 291 451	<i>SND1</i>	-10,02	1,66E-04	2,47E-03
17.0_41836514	17	41 836 514	<i>SOST</i>	5,58	2,04E-05	3,06E-04
15.0_44956213	15	44 956 213	<i>SPG11</i>	10,61	1,88E-04	2,79E-03
20.0_55904786	20	55 904 786	<i>SPO11</i>	-5,29	1,56E-03	2,25E-02
1.0_32281812	1	32 281 812	<i>SPOCD1</i>	9,03	2,89E-03	4,06E-02
1.0_152973720	1	152 973 720	<i>SPRR3</i>	5,56	6,66E-06	9,99E-05
2.0_45838841	2	45 838 841	<i>SRBD1</i>	-5,84	5,94E-04	8,73E-03
8.0_99955018	8	99 955 018	<i>STK3</i>	-8,15	7,58E-06	1,14E-04
7.0_135346635	7	135 346 635	<i>STMP1</i>	9,49	4,47E-12	6,73E-11
7.0_135346643	7	135 346 643	<i>STMP1</i>	10,16	8,40E-12	1,27E-10
7.0_135346705	7	135 346 705	<i>STMP1</i>	5,17	6,04E-12	9,11E-11
7.0_135346735	7	135 346 735	<i>STMP1</i>	7,81	1,66E-10	2,50E-09
7.0_135346884	7	135 346 884	<i>STMP1</i>	6,44	5,10E-11	7,68E-10



7.0_135346895	7	135 346 895	<i>STMP1</i>	7,38	2,81E-15	4,23E-14
7.0_135346914	7	135 346 914	<i>STMP1</i>	6,80	2,71E-08	4,08E-07
7.0_135346926	7	135 346 926	<i>STMP1</i>	5,92	1,03E-11	1,55E-10
8.0_70378760	8	70 378 760	<i>SULF1</i>	-5,62	1,25E-07	1,88E-06
20.0_31593239	20	31 593 239	<i>SUN5</i>	13,85	4,04E-04	5,96E-03
10.0_30026199	10	30 026 199	<i>SVIL</i>	5,70	2,73E-10	4,11E-09
10.0_29698248	10	29 698 248	<i>SVIL-AS1</i>	6,09	1,36E-03	1,97E-02
20.0_58508757	20	58 508 757	<i>SYCP2</i>	-9,08	1,98E-03	2,82E-02
17.0_34808203	17	34 808 203	<i>TBC1D3B</i>	-11,58	7,78E-04	1,14E-02
7.0_72993657	7	72 993 657	<i>TBL2</i>	13,94	1,26E-03	1,83E-02
8.0_496323	8	496 323	<i>TDRP</i>	7,42	3,56E-03	4,95E-02
7.0_100239180	7	100 239 180	<i>TFR2</i>	5,62	3,28E-03	4,59E-02
19.0_376532	19	376 532	<i>THEG</i>	7,90	2,34E-03	3,32E-02
11.0_57093322	11	57 093 322	<i>TNKS1BP1</i>	10,65	6,93E-04	1,02E-02
8.0_144443082	8	144 443 082	<i>TOP1MT</i>	-6,95	2,36E-03	3,35E-02
16.0_1305594	16	1 305 594	<i>TPSD1</i>	5,92	1,21E-03	1,76E-02
13.0_38445142	13	38 445 142	<i>TRPC4</i>	5,55	2,08E-03	2,96E-02
9.0_141044459	9	141 044 459	<i>TUBBP5</i>	-5,71	2,44E-03	3,45E-02
13.0_44980703	13	44 980 703	<i>TUSC8</i>	11,10	4,43E-04	6,54E-03
5.0_158689566	5	158 689 566	<i>UBLCP1</i>	-5,83	2,99E-04	4,43E-03
1.0_165796397	1	165 796 397	<i>UCK2</i>	5,56	1,62E-03	2,33E-02
5.0_140098398	5	140 098 398	<i>VTRNA1-2</i>	5,69	3,08E-03	4,32E-02
5.0_135416370	5	135 416 370	<i>VTRNA2-1</i>	8,61	1,82E-03	2,61E-02
5.0_135416381	5	135 416 381	<i>VTRNA2-1</i>	7,62	2,28E-03	3,23E-02
5.0_135416388	5	135 416 388	<i>VTRNA2-1</i>	7,49	2,86E-03	4,02E-02
5.0_135416394	5	135 416 394	<i>VTRNA2-1</i>	6,25	3,58E-08	5,38E-07
5.0_135416398	5	135 416 398	<i>VTRNA2-1</i>	6,28	1,73E-04	2,57E-03
5.0_135416405	5	135 416 405	<i>VTRNA2-1</i>	5,24	2,27E-06	3,41E-05
7.0_12444115	7	12 444 115	<i>VWDE</i>	9,45	7,88E-04	1,15E-02
4.0_39183395	4	39 183 395	<i>WDR19</i>	-6,19	2,76E-03	3,89E-02
19.0_34971881	19	34 971 881	<i>WTIP</i>	9,23	1,69E-03	2,43E-02
19.0_4246732	19	4 246 732	<i>YJU2</i>	-5,34	1,04E-06	1,56E-05
4.0_48491560	4	48 491 560	<i>ZAR1</i>	6,34	4,46E-10	6,72E-09
9.0_115819364	9	115 819 364	<i>ZFP37</i>	6,02	2,11E-06	3,17E-05
6.0_29648945	6	29 648 945	<i>ZFP57</i>	-9,91	6,27E-10	9,44E-09
6.0_29648961	6	29 648 961	<i>ZFP57</i>	-10,79	3,10E-03	4,34E-02
6.0_29648986	6	29 648 986	<i>ZFP57</i>	-7,04	3,20E-03	4,48E-02
6.0_29649024	6	29 649 024	<i>ZFP57</i>	-8,46	1,95E-03	2,78E-02
6.0_29649084	6	29 649 084	<i>ZFP57</i>	-9,38	4,00E-04	5,91E-03
6.0_29649135	6	29 649 135	<i>ZFP57</i>	-5,23	1,88E-04	2,80E-03
18.0_32957632	18	32 957 632	<i>ZNF396</i>	5,65	2,27E-05	3,40E-04
19.0_11908683	19	11 908 683	<i>ZNF491</i>	-7,31	3,32E-03	4,64E-02
19.0_58071638	19	58 071 638	<i>ZNF550</i>	6,58	1,49E-03	2,15E-02
19.0_56151538	19	56 151 538	<i>ZNF580</i>	-5,98	2,33E-03	3,31E-02
19.0_21264896	19	21 264 896	<i>ZNF714</i>	-6,44	2,61E-07	3,93E-06
19.0_21264930	19	21 264 930	<i>ZNF714</i>	-6,88	1,44E-04	2,14E-03
19.0_21264933	19	21 264 933	<i>ZNF714</i>	-7,39	1,55E-03	2,24E-02
19.0_21264948	19	21 264 948	<i>ZNF714</i>	-7,08	3,48E-04	5,15E-03